

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291709 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.09(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.11.30

(54) ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ОПСИНА И GPCR

(31) 01509/19

(72) Изобретатель:

(32) 2019.11.29

Кляйнлогель Соня, Ван Вик Михил
(CH)

(33) CH

(86) PCT/EP2020/083960

(74) Представитель:

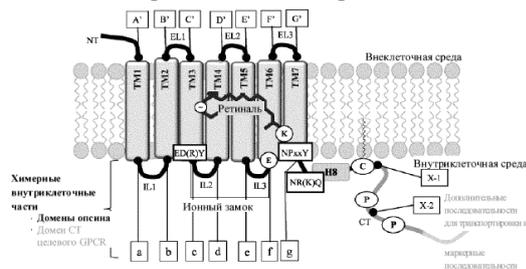
(87) WO 2021/105509 2021.06.03

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

УНИВЕРЗИТЕТ БЕРН (CH)

(57) Предусмотрен химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий светочувствительную часть из вышерасположенного опсина и целевую GPCR-часть, содержащий химерный СТ, который характеризуется сильной экспрессией и нацеливается на надлежащий субклеточный компартмент клеток-мишеней. Химерный белок на основе опсина и GPCR эффективно активирует нативный G-белок, специфичный для сигнального пути целевого GPCR, вызывая физиологический ответ, сравнимый с таковым у нативного целевого GPCR. Также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие химерный белок на основе опсина и GPCR, а также капсиды, векторы, клетки и носители, содержащие или экспрессирующие химерный белок на основе опсина и GPCR. Кроме того, предусмотрены способ получения посредством генной инженерии химерного белка на основе опсина и GPCR и пути медицинского применения химерного белка на основе опсина и GPCR.



A1

202291709

202291709

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574283EA/055

ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ОПСИНА И GPCR

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области оптогенетики и предлагает дополнительные светочувствительные химерные белки на основе опсина и GPCR. В частности, оно относится к химерным белкам GPCR, содержащим светочувствительный опсин и дополнительный белок GPCR, и кодирующим их молекулам нуклеиновых кислот, а также к способам конструирования таких молекул нуклеиновых кислот. Настоящее изобретение дополнительно относится к капсидам, векторам и частицам, содержащим химерные белки на основе опсина и GPCR или кодирующие их молекулы нуклеиновых кислот, а также к путям терапевтического применения, например, к лекарственным препаратам и способам генной терапии, в основе которых лежит световая активация и ее сопряжение с преднамеренно выбранным сигнальным каскадом, обеспечиваемое химерными белками на основе опсина и GPCR. Настоящее изобретение относится, в частности, к химерным белкам на основе опсина и mGluR6 и их применению для генотерапевтического лечения пациентов-людей или пациентов-животных, страдающих потерей зрения вследствие дегенерации фоторецепторов.

Предпосылки изобретения

Приблизительно один из 3000 человек страдает от генетической мутации, которая приводит к дегенерации фоторецепторов и слепоте. Несмотря на утрату фоторецепторов, нижерасположенные нейроны сетчатки остаются преимущественно нетронутыми. Недавние исследования продемонстрировали, что светочувствительность и функциональное зрение можно восстановить при введении светоактивируемых белков непосредственно в выжившую ткань сетчатки после утраты фоторецепторов (Lagali P.S. et al., 2008; van Wyk M et al., 2015; Сehajic-Кapetanovic J. et al. 2015).

В WO 2012/174674 раскрыты химерные светочувствительные белки на основе рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), содержащие внутриклеточные домены mGluR6. Один такой химерный белок GPCR содержит светочувствительный GPCR меланопсин и IL2, IL3 и CT mGluR6 и также называется Opto-mGluR6 (van Wyk M et al., 2015). Белки Opto-mGluR6 преимущественно представляют собой светоактивируемые версии эндогенного рецептора mGluR6 и, следовательно, способны обеспечивать сопряжение световой активации с mGluR6-специфичным внутриклеточным сигнальным каскадом путем активации G-белка G-альфа(о) - нативного белка mGluR6, присущего исключительно ON-биполярным клеткам-мишеням.

GPCR являются основными мишенями в фармацевтической промышленности (Sriram P. et al, 2018). Предшествующий уровень техники предусматривает и другие подходы для обеспечения оптической активации сигнальных каскадов G-белков, специфичных для целевого GPCR, рассматриваемые, например, в Optogenetic user's guide to Opto-GPCRs (Kleinlogel S., 2016) или, например, применяемые с химерным белком на

основе родопсина и опиоидного рецептора MOR, называемым Opto-MOR, для пространственно-временного контроля передачи сигнала через опиоидные рецепторы и поведения (Siuda et al. 2015).

Таким образом, функционально активные химерные белки на основе опсина и GPCR обеспечивают двойную функцию: во-первых, они являются светоактивируемыми, т. е. они чувствительны к свету благодаря своей светочувствительной опсиновой части; во-вторых, они обеспечивают сопряжение световой активации с сигнальным путем GPCR с участием целевого белка GPCR.

Белки GPCR (рецепторные белки, сопряженные с G-белком; сокращенно GPCR) представляют собой наиболее крупное суперсемейство рецепторов в геноме человека и подразделяются на пять семейств (или классов) в соответствии с системой филогенетической классификации GRAFS, основанной на гомологии и функциональном сходстве последовательностей (Schiöth, H.B. and Fredriksson R, 2005).

Класс А является наиболее крупным и наиболее изученным семейством белков GPCR. Его также называют семейством родопсинов в честь его "прототипа".

GPCR всех семейств имеют высококонсервативную третичную структуру и сходный способ активации: все GPCR содержат семь трансмембранных доменов (TM1-TM7), соединенных тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными петлями (EL и IL) различной длины, а также внеклеточный N-концевой домен (NT) и внутриклеточный C-концевой домен (CT).

Кроме того, большинство GPCR класса А, а также многие или даже большинство белков GPCR других классов GPCR, и в частности также GPCR класса С, содержат, помимо семи трансмембранных спиралей (TM1-TM7), восьмую спираль (H8) ниже TM7 (Bruno et al, 2012). H8 представляет собой субдомен CT в проксимальной области CT у GPCR, но не трансмембранную спираль. Скорее, H8 располагается параллельно цитоплазматической поверхности клеточной мембраны и смежно с ней, и поэтому иногда ее называют амфотерной спиралью.

Рецепторные белки GPCR физиологически взаимодействуют с гетеротримерными G-белками, состоящими из трех функциональных субъединиц, а именно субъединиц G-альфа, G-бета и G-гамма. G-белки были классифицированы на четыре подсемейства, а именно Gs, Gi/o, Gq/11 и G12/13, на основании структурного сходства их альфа-субъединиц и типа модулирующего ответа, который они индуцируют. Каждый GPCR преимущественно сопряжен с G-белками из одного подсемейства, тем самым стимулируя преимущественно один сигнальный каскад. Структурное взаимодействие между GPCR-рецепторами и G-белками было предметом многих исследований, обобщенно представленных, например, у Moreira I, 2014. Четыре основных класса G-белков сами подразделяются на подклассы. Например, mGluR6 в своей активированной фазе связывается с G-альфа(o), который является представителем подкласса G-альфа(i/o).

Иллюстративными эндогенными G-белками, присутствующими в физиологической клеточной среде иллюстративных исходных опсинов, являются G(альфа)q в случае

меланопсина, G(альфа)t в случае опсинов колбочек и G(альфа)s в случае опсина медуз.

Примечательно, что представители любого семейства GPCR, несмотря на их сходную трехмерную структуру, практически не демонстрируют сходства последовательностей с представителями других семейств (Kleinlogel, 2016), за исключением нескольких консервативных аминокислот и коротких мотивов, идентифицируемых путем структурного выравнивания трех основных классов GPCR А, В и С, которые важны для функционирования, передачи сигнала и 3D-конформационной стабильности (Schwartz et al. 2006, Nygaard et al. 2013).

В последнее десятилетие был произведен обмен доменами между двумя GPCR, в частности между светоактивируемыми опсиновыми GPCR и лиганд-активируемыми отличными от опсиновых белками GPCR, с получением нескольких примеров функционально активных химерных белков GPCR. Данные химерные GPCR активируются лигандом или, в частности, светом, что характерно для первого белка GPCR, и при этом они обеспечивают сопряжение данной сигнальной активации со вторым белком GPCR путем связывания с белком G-альфа, что характерно для второго белка GPCR (Kleinlogel, 2016; Morri et al., 2018; Siuda et al., 2015). Такой обмен доменами, несмотря на отсутствие сходства последовательностей, стал возможным после выравнивания последовательностей белков GPCR и идентификации доменов с использованием описанных ниже консервативных мотивов в качестве ориентиров.

Некоторые из вышеупомянутых высококонсервативных аминокислот и коротких мотивов расположены в участке соединения между внутриклеточным и трансмембранным доменами, в частности:

— высококонсервативный мотив E(D)RY (SEQ ID NO: 80) в участке соединения (c) между TM3 и IL2,

— глутаматный остаток (E) в участке соединения (f) между IL3 и TM6, которые вместе образуют "ионный замок" между TM3 и TM6, стабилизирующий неактивное состояние GPCR;

— мотив NPxxY (SEQ ID NO: 81) в участке соединения (g) между TM7 и проксимальным концом СТ, в частности между TM7 и проксимальным концом спирали 8 (H8).

Как ионный замок между TM3 и TM6, образованный сайтом E(D)RY в участке соединения TM3 и IL2 и глутаматным остатком в участке соединения IL3 и TM6, так и мотив NPxxY на конце TM7 создают важные структурные ограничения, которые перестраиваются в ответ на сигнал, например, при фотоизомеризации ретиналя путем световой активации или при связывании лиганда, за счет чего образуется активированная конформация белков GPCR (Fritze et al. 2003).

Последовательность NR(K)Q (например, НРК или НЕР) (SEQ ID NO: 82) представляет собой дополнительный высококонсервативный мотив на проксимальном конце H8 в проксимальной области СТ у большинства GPCR, в частности GPCR класса А и класса С. Мотив NR(K)Q и проксимальная область СТ, которая зачастую содержит H8,

по-видимому, имеют отношение к конформационному "переключению" белков GPCR при их активации, т. е. стимулируются при связывании лиганда или, в случае опсинов, при поглощении света. Кроме того, мотив NR(K)Q и проксимальная область СТ считаются важными для связывания аррестина для контроля активности GPCR (например, Sato T, 2019).

Химерные белки на основе опсина и GPCR демонстрируют высококонсервативную третичную структуру рецепторных белков GPCR, содержащую семь трансмембранных доменов и содержащую высококонсервативные мотивы, такие как, в частности, мотив E(D)RY на дистальном конце ТМ3 и мотив NPxxY на дистальном конце ТМ7.

Дополнительные частично консервативные структурные элементы и мотивы включают следующее.

- Один или два сайта пальмитоилирования, которые расположены непосредственно после Н8 в дистальном направлении и соответствуют С322 и С323 бычьего родопсина (Ovchinnikov Yu A, 1988). Ковалентная модификация аминокислотных остатков, соединенных с пальмитиновой кислотой, приводит к закориванию дистального конца Н8 в мембране. У большинства опсинов цистеиновый остаток на дистальном конце Н8 является пальмитоилированным. Считается, что пальмитоилирование аминокислотных остатков на дистальном конце Н8 вовлечено главным образом в мембранную локализацию, привлечение к липидным рафтам и стабилизацию белка GPCR. Некоторые исключительные опсины, например, опсины колбочек OPN1MW и OPN1LW, не содержат пальмитоилированной аминокислоты на дистальном конце Н8.

- Сайты фосфорилирования на С-конце, которые обычно расположены за сайтом пальмитоилирования в дистальном направлении. Сайты фосфорилирования, как правило, относятся к фосфорилированным сериновым или треониновым или иногда к тирозиновым остаткам. Сайты фосфорилирования вовлечены в десенсибилизацию и интернализацию в ходе метаболизма GPCR-рецептора. Они также определяют предпочтения связывания регуляторов активности, таких как, в частности, рецепторная киназа, сопряженная с G-белком (GRK), и аррестин, которые влияют на кинетику передачи сигнала, опосредованной G-белком. Например, меланопсин имеет особенно длинный С-конец со множеством сайтов фосфорилирования, и, в частности, было показано, что некоторые дистальные сайты фосфорилирования способствуют прекращению замедления передачи сигнала (см. Mure L. et al, 2016) в пользу временно-интегративной физиологической функции данного опсина, определяющего ритм биологических часов.

Опсины содержат дополнительные консервативные мотивы. В частности, в хромофорном кармане присутствуют два консервативных мотива для ковалентного связывания хромофора. Хромофор всех животных опсинов представляет собой 11-цис-ретиналь. В хромофорном кармане есть два высококонсервативных мотива:

- консервативный лизин (K) в ТМ7, который ковалентно связан с хромофором 11-цис-ретиналем через основание Шиффа,
- отрицательный противоион (E) в ТМ3, который стабилизирует связывание

основания Шиффа с 11-цис-ретиналем.

Другими словами, хромофорный карман содержит основание Шиффа, лизиновый остаток в TM7, который ковалентно связывает хромофор, и дополнительно содержит отрицательный противоион в TM3.

По-прежнему существует потребность в дополнительных светочувствительных химерных белках GPCR, которые получены посредством генной инженерии так, чтобы они демонстрировали особенно благоприятные свойства для их применения в медицинской терапии, как, например, для восстановления и модулирования физиологической функции или регуляции активности GPCR-рецепторов. Особенно благоприятные свойства включают, например, конформационную стабильность, физиологически подходящие кинетические свойства, значительную величину ответа и эффективную внутриклеточную транспортировку к месту физиологической локализации целевого GPCR.

Также по-прежнему существует потребность в светочувствительной химерной молекуле на основе опсина и GPCR, содержащей дополнительные целевые GPCR для дополнительных путей медицинского применения. Неограничивающие примеры желаемых терапевтических целей для светоактивируемых рецепторных белков GPCR в дополнительных путях медицинского применения включают, например, лечение боли, сердечной недостаточности, тревожности или нарушения цветового зрения.

Кроме того, по-прежнему существует потребность в дополнительных руководствах по разработке функционально активных химерных светочувствительных белков на основе опсина и GPCR, которые можно получить посредством генной инженерии. Простые и эффективные способы генной инженерии, позволяющие получить светочувствительные белки на основе опсина и GPCR, по-прежнему необходимы не только для физиологического восстановления дегенерированных фоторецепторов с помощью генной терапии, но и для манипуляций с активностью других целевых белков GPCR, которые могут быть пригодны для дополнительных путей применения.

Краткое описание изобретения

Следовательно, общая цель настоящего изобретения заключается в удовлетворении таких вышеупомянутых потребностей и получении химерных белков GPCR из опсина и дополнительного белка GPCR, называемого целевым белком GPCR.

Конкретной целью настоящего изобретения является получение дополнительных химерных белков на основе опсина и mGluR6, демонстрирующих одно или несколько особенно благоприятных свойств, для их применения в генной терапии пациентов с частичной или полной утратой зрения, например, по причине отсутствия или недостаточности светочувствительной сигнальной активности, обеспечиваемой их природными фоторецепторами.

Конкретной целью настоящего изобретения является конструирование химерных белков на основе опсина и GPCR с одним или несколькими конкретными благоприятными свойствами, включающими, например, эффективную экспрессию в их клетках-мишенях,

такую как, например, эффективная экспрессия химерной молекулы на основе опсина и mGluR6 в ON-биполярных клетках; их эффективную и специфическую внутриклеточную сортировку в их клетке-мишени, такую как, например, дендритная транспортировка химерной молекулы на основе опсина и mGluR6 в сигналосому mGluR6 в ON-биполярных клетках; эффективное сопряжение с сигнальным путем G-белка с участием нативного GPCR в клетке-мишени, такое как, например, сопряжение с G α o в биполярных клетках; демонстрируемую конформационную стабильность, способность производить физиологический результат с физиологической кинетикой и низкой десенсibilизацией.

Дополнительной целью настоящего изобретения является получение простого принципа химерной конструкции на основе опсина и GPCR, применимой к любому целевому GPCR, для обеспечения световой активации сигнального каскада G-белка, специфичного для целевого GPCR. Данная цель удовлетворяет потребность в простом способе разработки и получения посредством генной инженерии химерных белков на основе опсина и GPCR, в частности, для их применения при физиологических манипуляциях с клетками или в генной терапии или в других путях медицинского и фармакологического применения.

Дополнительной целью настоящего изобретения является модулирование выбранного клеточного ответа с помощью химерного белка на основе опсина и GPCR, в частности, также для применения в средствах оптогенетической терапии, что позволяет восстановить или улучшить сигнальный путь с участием терапевтического GPCR с исключительной специфичностью, которая не достигается с помощью современных фармацевтических средств.

Неограничивающие примеры данной цели настоящего изобретения включают получение дополнительных химерных белков на основе опсина и GPCR, таких как, например, химерные белки на основе опсина и опиоидного GPCR-рецептора, химерные белки на основе опсина и гидрокситриптаминового GPCR-рецептора (HT), химерные рецепторы GABA(B) и химерные белки на основе опсина и бета-адренергического GPCR-рецептора, для применения в качестве лекарственного препарата.

Цели настоящего изобретения соответственно дополнительно включают получение генно-инженерных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих разработанные химерные белки на основе опсина и GPCR, способы получения посредством генной инженерии и экспрессии молекул нуклеиновых кислот, содержащих слитые гены, кодирующие химерные белки на основе опсина и GPCR, а также медицинские, в частности генотерапевтические, продукты и способы с использованием химерных белков на основе опсина и GPCR или кодирующих их молекул нуклеиновых кислот соответственно.

Для реализации этих и еще некоторых других целей настоящего изобретения, которые станут более очевидными по ходу дальнейшего описания, химерный белок на основе опсина и GPCR и связанные с ним аспекты настоящего изобретения представлены в виде описанных ниже признаков.

В первом аспекте настоящего изобретения предусмотрен химерный белок на

основе опсина и GPCR.

Химерный белок на основе опсина и GPCR содержит семь трансмембранных доменов (TM1-TM7), соединенных вне- и внутриклеточными петлями (EL и IL) различной длины.

Химерный белок на основе опсина и GPCR содержит **светочувствительную опсиновую часть из вышерасположенного опсина** и вторую GPCR-часть, называемую целевой GPCR-частью, из **второго белка, называемого целевым белком GPCR.**

Целевая GPCR-часть содержит С-концевой домен целевого GPCR (**СТ целевого GPCR** или, кратко, целевой СТ).

Часть из вышерасположенного опсина содержит хромофорный карман, ковалентно связывающий хромофор.

Часть из вышерасположенного опсина дополнительно содержит усеченный С-концевой домен. Данный усеченный СТ вышерасположенного опсина имеет **сайт усечения**, расположенный на дистальном конце проксимальной области СТ вышерасположенного опсина (**проксимальной области О-СТ**) или ниже него.

Данная проксимальная область О-СТ содержит мотив NR(K)Q и следующие за ним 7-13 аминокислот в дистальном направлении,

при этом указанный химерный белок на основе опсина и GPCR содержит **химерный С-концевой домен (химерный СТ).**

СТ целевого GPCR расположен ниже усеченного СТ опсина.

Как более подробно описано ниже, проксимальная область СТ большинства опсинов содержит субдомен, называемый спиралью 8 (Н8), начинающийся с мотива NR(K)Q и заканчивающийся в аминокислотном положении, которое на примерно 7-13 аминокислот ниже него. Недавно структурные данные указали на потенциально важную роль Н8 в связывании G-белка и модулировании активности (Ahn et al., 2010, Sato, 2019, Tsai, et al., 2018). С другой стороны, как было обнаружено авторами настоящего изобретения, специфичность связывания G-белка модулируется более дистальными областями СТ. Н8 зачастую заякорена на своем дистальном конце одним или несколькими сайтами пальмитоилирования в цитоплазматической мембране. Дистальный конец проксимальной области О-СТ может быть расположен в любом аминокислотном положении, которое находится на примерно 10 аминокислот, т. е. 7-13, или 8-12, или 9-11 аминокислот ниже дистального конца мотива NR(K)Q. В литературе Н8 иногда рассматривают в качестве дополнительного домена GPCR, расположенного между доменами TM7 и СТ, а иногда рассматривают в качестве субдомена СТ. В данном тексте Н8 называют субдоменом СТ.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления дистальный конец проксимальной области О-СТ расположен в положении, выбранном из группы, включающей:

- положение на дистальном конце **спирали 8 (Н8),**
- положение в **сайте пальмитоилирования** или

- положение, соответствующее сайту пальмитоилирования в бычьем родопсине.

Второй белок GPCR называют **целевым GPCR**, поскольку светоактивируемый химерный белок на основе опсина и GPCR больше не обеспечивает сопряжение своей активации с сигнальным путем природного опсина, а вместо этого обеспечивает ее сопряжение с сигнальным путем преднамеренно выбранного целевого GPCR, который применяется при разработке и конструировании химерного белка на основе опсина и GPCR посредством генной инженерии.

Неожиданным обнаружением автора настоящего изобретения было то, что С-концевой домен, содержащий проксимальную область СТ вышерасположенного опсина (проксимальную область О-СТ), вместе с СТ целевого GPCR (целевым СТ) является достаточным для эффективного сопряжения световой активации химерного белка на основе опсина и GPCR с сигнальным каскадом целевого GPCR. Это относится, в частности, к субклеточной транспортировке, кинетике ответа, **специфичности связывания G-белка и взаимодействию с внутриклеточными партнерами по связыванию** химерного белка на основе опсина и GPCR, которая имитирует соответствующие характеристики целевого белка GPCR.

Впервые это наблюдали с химерными белками на основе опсина и GPCR, содержащими вышерасположенный опсин, который был усечен по сайту пальмитоилирования на дистальном конце проксимальной области О-СТ и подвергнут сплайсингу вместе с целевым СТ.

В действительности очень неожиданно, что химерные белки на основе опсина и GPCR, содержащие усеченный вышерасположенный СТ и целевой СТ, т. е. содержащие химерный СТ, осуществляют сопряжение с сигнальным путем целевого GPCR даже при отсутствии какой-либо внутриклеточной петли целевого белка GPCR, и при этом ответ соответствует физиологическому ответу нативного целевого белка GPCR или превосходит его. Усеченный СТ опсина со встроенной в него проксимальной областью О-СТ вызывает значительное увеличение эффективности активации G-белка целевым СТ.

Белки на основе опсина и GPCR по настоящему изобретению разработаны так, чтобы они содержали проксимальную область О-СТ для усиления активации светоактивируемого G-белка. С другой стороны, они разработаны так, чтобы они не содержали весь СТ вышерасположенного опсина. Вместо этого из химерного белка на основе опсина и GPCR исключены области СТ вышерасположенного опсина, которые расположены дистально относительно проксимальной области О-СТ и которые вовлечены в субклеточную транспортировку, регуляцию кинетики и, как показано в настоящем изобретении, специфичность в отношении G-белка. Другими словами, только часть химерного белка на основе опсина и GPCR, представляющая собой целевой GPCR, содержит С-концевые области, которые индуцируют эти формы физиологической активности. Таким образом, предотвращается интерференция молекулярной информации, получаемой от СТ вышерасположенного опсина, с информацией от СТ целевого GPCR, и поэтому усиливаются специфичность в отношении G-белка, специфичность субклеточной

локализации и регуляция кинетики, относящиеся к целевому GPCR. Таким образом, химерные белки на основе опсина и GPCR при световой активации имитируют ответ целевого GPCR, и световая активация эффективно сопрягается с сигнальным каскадом целевого GPCR.

В химерный белок на основе опсина и GPCR по настоящему изобретению необязательно можно добавить внутриклеточные петли целевого белка GPCR, но это не является обязательным условием. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает получение посредством генной инженерии светоактивируемых химерных белков на основе опсина и GPCR при необходимости лишь с одним-единственным сайтом слияния генов в сайте усечения СТ вышерасположенного опсина, который подвергнут сплайсингу вместе с проксимальным концом целевого СТ.

Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены дополнительные химерные молекулы на основе опсина и GPCR, для которых необходима лишь минимальная генная инженерия, которые характеризуются сильной экспрессией в надлежащем субклеточном компартменте клеток-мишеней, а также эффективно активируют сигнальный путь нативного G-белка в клетках-мишенях, вызывая ответ, который имитирует физиологический ответ целевого GPCR.

На удивление, описываемые в данном документе химерные белки на основе опсина и GPCR, даже при отсутствии всех внутриклеточных петель, имитируют физиологический ответ, специфичный для целевого GPCR, по сравнению с химерными светочувствительными GPCR, которые доступны в предшествующем уровне техники, такими как, например, Opto-mGluR6 (van Wyk et al. 2015).

В некоторых вариантах осуществления целевой белок GPCR представляет собой метаботропный глутаматный рецептор 6 (mGluR6). mGluR6 является эндогенным белком GPCR в ON-биполярных клетках сетчатки, который в здоровом физиологическом зрительном сигнальном каскаде активируется глутаматом и обеспечивает сопряжение своей активации со зрительным сигнальным каскадом путем связывания с белком G-альфа(о). ON-биполярные клетки представляют собой нейроны сетчатки, которые расположены непосредственно ниже физиологических фоторецепторных клеток в зрительном сигнальном каскаде.

Первый аспект настоящего изобретения дополнительно относится к химерному С-концевому пептиду, содержащему проксимальную область О-СТ и СТ целевого GPCR или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления химерного С-концевого пептида таким функциональным вариантом СТ целевого GPCR является дистальный С-концевой фрагмент целевого GPCR с проксимальным концом на дистальном конце Н8 или в сайте пальмитоилирования. В некоторых вариантах осуществления химерного С-концевого пептида С-концевой фрагмент дополнительно содержит Н8 из СТ целевого GPCR.

Второй аспект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR и химерный С-концевой

пептид согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Третий аспект настоящего изобретения относится к **капсиду AAV для медицинского применения** переноса молекулы нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту, в клетку-мишень. Третий аспект дополнительно относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей капсид.

Независимое изобретение относится к новому рационально разработанному капсиду аденоассоциированного вируса (AAV) для упаковки и транспорта трансгена в клетки-мишени, а также к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей данный капсид. Независимое изобретение относится, в частности, к переносу молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR, в клетку-мишень.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к частицам, в частности наночастицам, везикулам, клеткам, в частности за исключением зародышевых клеток, и животным, содержащим или экспрессирующим молекулы нуклеиновых кислот согласно второму аспекту или векторы согласно третьему аспекту или содержащим химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к способу получения посредством генной инженерии молекул нуклеиновых кислот согласно второму аспекту, кодирующих химерные белки на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Седьмой аспект настоящего изобретения относится к продуктам, связанным с химерными белками на основе опсина и GPCR согласно настоящему изобретению, для медицинского применения. В частности, седьмой аспект относится к химерным белкам на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту, или молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный белок на основе опсина и GPCR, согласно второму аспекту, или капсиду или молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный капсид, в обоих случаях согласно третьему аспекту, или вектору согласно четвертому аспекту, или частице, везикуле или клетке для применения в медицинской терапии. Седьмой аспект дополнительно относится к лекарственным препаратам и способам лечения с применением вышеупомянутых продуктов на основе химерных белков GPCR согласно настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления вышеупомянутых аспектов настоящего изобретения относятся, в частности, к химерным белкам на основе опсина и mGluR6 или химерным белкам на основе опсина и GPCR, содержащим два опсина, и к их применению для генной терапии пациентов, страдающих частичной или полной потерей зрения, в частности вследствие дегенерации фоторецепторов.

Краткое описание графических материалов

Настоящее изобретение будет лучше понято, а цели, отличные от изложенных выше, станут очевидны при уделении внимания его последующему подробному описанию. В таком описании представлены ссылки на прилагаемые графические материалы.

Фиг. 1. Общая структура опсина.

Фиг. 2. Схема иллюстративного химерного белка на основе опсина и GPCR.

Фиг. 3. Иллюстративный вариант осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6.

Фиг. 4. Иллюстративные варианты осуществления химерных белков на основе опсина и GPCR, которые нацелены на клеточную мембрану.

Фиг. 5. Иллюстративные варианты осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6 с химерным С-концом, усиливающим светоактивируемые токи, опосредованные молекулами на основе опсина и mGluR6, по сравнению с исходным опсином.

Фиг. 6. Пример функционального скрининга *in vitro* химерных белков на основе опсина и GPCR с применением клеток HEK-GIRK.

Фиг. 7. Эксперименты на планшет-ридере, в которых изучается перенацеливание G-белка и селективность иллюстративных вариантов осуществления химерных белков на основе опсина и GPCR в отношении сигнальных путей.

Фиг. 8. Надлежащая транспортировка иллюстративных вариантов осуществления химерных вариантов на основе опсина и mGluR6 *in vivo* в дендриты и сигналосомы mGluR6 ON-биполярных клеток.

Фиг. 9. Иллюстративные варианты осуществления химерных белков на основе опсина и GPCR mGluR6 делают выделенные ON-биполярные клетки чувствительными к прямому свету.

Фиг. 10. Результаты измерений *in vivo* остроты зрения слепых мышей, получавших лечение с помощью генной терапии с использованием AAV с иллюстративными вариантами осуществления химерных вариантов на основе опсина и mGluR6.

Фиг. 11. Ответы на свет *ex vivo*, зарегистрированные от ганглионарных клеток сетчатки в образцах сетчатки слепых мышей *rd1*, обработанных иллюстративными вариантами осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6.

Фиг. 12. Микрофотография вертикальных криосрезов сетчатки из двух образцов сетчатки слепых мышей *rd1* после интравитреальной генной терапии с помощью иллюстративного варианта осуществления AAV, экспрессирующего иллюстративный вариант осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6.

Фиг. 13. Светоиндуцированные токи, измеренные с помощью способа локальной фиксации потенциала на целой клетке для иллюстративной химерной молекулы JSR1(S186F)palm-beta2AR, экспрессируемой в клетках HEK293-GIRK.

Определения и подробное описание

Если не определено иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные используемые в данном документе термины имеют значения, указанные в представленном ниже описании.

Используемые в данном документе и в формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в данном ряду.

В данном тексте термин "содержать" или "содержащий" определен как включающий указанный элемент, или стадию, или группу элементов или стадий. В данном тексте термин "содержать" или "содержащий" обычно не исключает какой-либо другой элемент, или стадию, или группу элементов или стадий. Кроме того, термин "содержать" или "содержащий" в данном тексте также относится к точному указанию элемента, или стадии, или группы элементов или стадий. Только в данном последнем случае значение термина "содержать" или "содержащий" фактически совпадает с термином "состоящий из", который обычно исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения.

Первый аспект настоящего изобретения относится к химерным белкам на основе опсина и GPCR. Фраза "**химерный белок на основе опсина и GPCR**", предусматривающая светочувствительную **часть из вышерасположенного опсина** и вторую GPCR-часть (**целевую GPCR-часть**) из второго белка GPCR, относится к светочувствительному генно-инженерному белку GPCR, имеющему третичную структуру, которая является характерной консервативной структурой среди описанных выше белков GPCR. Химерные белки на основе опсина и GPCR, в качестве альтернативы называемые (химерными) рецепторами на основе опсина и GPCR, или (химерными) молекулами на основе опсина и GPCR, или химерными GPCR, и химерные молекулы нуклеиновых кислот или химерные (слитые) гены, кодирующие их, можно получить, в частности, с помощью методик генной инженерии, которые известны из уровня техники, в том числе, например, путем разрезания исходных генов и лигирования выбранных частей исходных генов или, например, синтеза молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют химерный белок на основе опсина и GPCR или его фрагменты. Часть из вышерасположенного опсина придает химерному GPCR-рецептору светочувствительность и способность к активации при воздействии света. Вторую GPCR-часть называют целевой GPCR-частью, поскольку она обеспечивает сопряжение световой активации химерного белка на основе опсина и GPCR с G-белком, специфичным для физиологического сигнального пути целевого GPCR, как пояснялось выше. Иллюстративные целевые GPCR включают, например, β -адренергический рецептор, рецептор GABA(B), MOR, мю-опиоидный рецептор, серотониновые рецепторы, такие как 5-HT7, второй опсин, такой как OPN1, и метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR), такие как mGluR6 или mGluR5.

В данном тексте опсин и целевой GPCR, из которых получен химерный белок на основе опсина и GPCR, называются **исходными GPCR**. Так, например, химерный белок на основе меланопсина и mGluR6 соответственно разрабатывают и конструируют с использованием частей, представляющих собой исходный GPCR меланопсин и исходный mGluR6. Как очевидно из контекста, термин "исходный GPCR" относится к исходному белку GPCR, либо к исходному гену GPCR, либо к ним обоим.

В данном тексте термин "**белок GPCR**" относится к рецепторному белку, сопряженному с G-белком.

В данном тексте термин "опсин" относится к светочувствительным представителям класса А белков GPCR, и в частности он относится к физиологическим природным опсинам. Термин "опсин" в некоторых вариантах осуществления может также включать функционально активные, т. е. светочувствительные, опсины, которые представляют собой варианты природных опсинов, обычно имеющие консервативную 3D-структуру GPCR и консервативные мотивы, которые дополнительно описаны ниже. Такие генетические варианты опсинов кодируются молекулой нуклеиновой кислоты, полученной, например, из мутантного гена опсина или полученной из генно-инженерного, например, химерного, гена опсина, кодирующего функциональный светочувствительный опсин.

Аналогично, термин "целевой GPCR" обычно относится к физиологическому встречающемуся в природе целевому GPCR и в некоторых вариантах осуществления относится к вариантам природных целевых GPCR, таким как варианты mGluR6, которые обычно демонстрируют вышеупомянутую консервативную 3D-структуру GPCR и консервативные мотивы и которые являются функциональными, т. е. способны обеспечивать эффективное сопряжение активации с сигнальным путем целевого GPCR. Такие варианты целевых GPCR кодируются молекулой нуклеиновой кислоты, полученной, например, из мутантного гена целевого GPCR или полученной из генно-инженерного, например, химерного, гена целевого GPCR, кодирующего функционально активный целевой белок GPCR.

Соответственно, в данном тексте термин "домен" или "субдомен" в некоторых вариантах осуществления может включать помимо физиологических природных доменов белка GPCR генетический вариант домена или субдомена, такой как, например, мутантный или генно-инженерный, например, химерный или синтетический домен или субдомен, который функционально имитирует природный домен или субдомен GPCR.

Каждый домен части из вышерасположенного опсина кодируется фрагментом гена, полученным из гена, кодирующего вышерасположенный опсин (гена вышерасположенного опсина), или его генетического варианта. Каждый домен целевой GPCR-части кодируется фрагментом гена, полученным из гена целевого GPCR или его генетического варианта. Совместно все домены химерного белка на основе опсина и GPCR, которые кодируются фрагментами гена вышерасположенного опсина, называются частью из вышерасположенного опсина, и, по аналогии, совместно все домены или

субдомены, кодируемые фрагментами гена целевого GPCR, называются целевой GPCR-частью. В некоторых вариантах осуществления часть из вышерасположенного опсина и/или целевая GPCR-часть могут быть получены из одного или нескольких, в частности из двух или трех, исходных генов.

Целевые GPCR могут быть выбраны из любого класса GPCR, в частности из классов А, В или С, более конкретно из классов А или С. Иллюстративные целевые GPCR класса А включают, например, опсины колбочек, серотониновые рецепторы (например, 5-НТ7), мю-опиоидные или β-адренергические рецепторы. Иллюстративные целевые GPCR класса В включают, например, *рецептор глюкогона* (GCGR) и другие рецепторы гормонов. Иллюстративные целевые GPCR класса С включают, например, метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR, например, mGluR6, mGluR5) или рецептор GABA_B.

Существует шесть участков соединения, образующих область перехода между трансмембранными и внутриклеточными доменами белков GPCR и, соответственно, между кодирующими их фрагментами гена, которые называются участком соединения (a) между TM1 и IL1, участком соединения (b) между IL1 и TM2, участком соединения (c) между TM3 и IL2 и так далее до участка соединения (g) между TM7 и СТ, как показано на фиг. 1.

Аналогично, существует также шесть участков соединения, образующих область перехода между трансмембранными и внеклеточными доменами белков GPCR и кодирующими их фрагментами гена, которые называются участком соединения (A') между NT и TM1, участком соединения (B') между TM2 и EL1, участком соединения (C') между EL1 и TM3 и так далее до участка соединения (G') между EL3 и TM7, как показано на фиг. 2.

В данном тексте термин "**консервативный мотив**", широко используемый в данной области техники, не ограничивается мотивом, состоящим из исключительно одинаковых, например, 3-5, аминокислот, которые обычно упоминаются, когда речь идет о конкретном консервативном мотиве. Скорее, каждый из этих консервативных мотивов назван в честь особенно часто встречающейся последовательности-прототипа, представляющей несколько альтернативных вариантов, таких как, например, включенные ниже в таблицу 1.

Кроме того, из консервативных мотивов можно получить функциональные варианты. Например, функциональные варианты **мотива E(D)RY** (ERY и DRY) включают DRIY (SEQ ID NO: 83), NRIY (SEQ ID NO: 84) или NRY, при этом все они позволяют получить светочувствительные химерные белки на основе опсина и GPCR mGluR6 (см. WO 2012/174674). Иллюстративные функциональные варианты консервативных мотивов также показаны ниже в таблице 2.

Очевидно, что некоторые консервативные мотивы встречаются в участках соединения между доменами ТМ и внутриклеточными доменами или вблизи них, т. е. в участках соединения между трансмембранными спиралями (TM1-TM7) и внутриклеточными петлями (IL1-IL3) и С-концом (СТ) или вблизи них. Однако не все

участки соединения обязательно содержат высококонсервативный мотив.

В данном тексте термин "**мотив NPxxY**" относится к консервативному мотиву на дистальном конце TM7, т. е. вблизи участка соединения TM7/CT белка GPCR, в частности исходного вышерасположенного опсина, или исходного целевого GPCR, или химерного белка на основе опсина и GPCR, и определяется удовлетворением одному или нескольким из следующих критериев:

А) он представляет собой последовательность из 5 последовательных аминокислот последовательности NPxxY в соответствии с однобуквенным кодом для аминокислот, где x соответствует любому аминокислотному остатку;

В) он представляет собой последовательность, соответствующую мотиву NPxxY конкретного GPCR, который указан, например, в представленной ниже таблице I;

С) он представляет собой последовательность из 5 аминокислот, которая при выравнивании аминокислотной последовательности исходного GPCR, в частности исходного вышерасположенного опсина, с аминокислотной последовательностью бычьего родопсина соответствует последовательности N(302)PxxY(136) бычьего родопсина.

Мотив NPxxY присутствует и поддается идентификации во всех GPCR класса А, а также в большинстве других GPCR, хотя и демонстрирует значительную изменчивость последовательности (см., например, таблицу 2 в Sato, 2019).

В данном тексте термин "**мотив NR(K)Q**" относится к консервативному мотиву в проксимальной области СТ на несколько аминокислот ниже мотива NPxxY белка GPCR, в частности исходного вышерасположенного опсина, или исходного целевого GPCR, или химерного белка на основе опсина и GPCR, и СТ опсина вблизи проксимального конца Н8 и определяется удовлетворением одному или нескольким из следующих критериев:

А) он представляет собой последовательность, соответствующая мотиву NR(K)Q для конкретного GPCR, в частности исходного вышерасположенного опсина, который указан в таблице I или в Davies et al. 2010;

В) он представляет собой последовательность из 3-4 аминокислот, которая при выравнивании аминокислотной последовательности исходного GPCR, в частности исходного вышерасположенного опсина, с аминокислотной последовательностью бычьего родопсина соответствует последовательности N(310)KQ(312) бычьего родопсина.

Мотив NR(K)Q присутствует и поддается идентификации во всех GPCR класса А, а также в большинстве других GPCR. В частности, мотив NR(K)Q соответствует последовательности из 3-4 последовательных аминокислот, которая поддается идентификации путем выравнивания последовательности с бычьим родопсином, хотя и демонстрирует значительную изменчивость последовательности. Мотив NR(K)Q включает такие последовательности, как НРК, или НРЕ, или НКQ, или НРР, или ИРК, или ДУК, и другие (Davies W. et al., 2010).

В данном тексте термины "**сайт пальмитоилирования**" и "аминокислотное положение, соответствующее сайту пальмитоилирования" (последнее для краткости также называют сайтом пальмитоилирования) определяются удовлетворением одному или

нескольким из нижеследующих критериев А, В, С и D. В частности, термин "сайт пальмитоилирования" удовлетворяет одному критерию, например, А, или удовлетворяет двум критериям В и С, или В и D, или С и D, или трем критериям В, С и D. Критерии А-D являются следующими:

А) он представляет собой пальмитоилированный аминокислотный остаток в СТ исходного GPCR, в частности исходного опсина;

В) он представляет собой способный к пальмитоилированию аминокислотный остаток в СТ исходного GPCR, в частности исходного опсина, расположенный на по меньшей мере 7 аминокислот, в частности на по меньшей мере 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13 аминокислот, ниже дистального конца мотива NR(K)Q опсина, который выбран из следующих аминокислот: цистеина (С), серина (S), треонина (Т), тирозина (Y) или триптофана (W);

С) он представляет собой аминокислотный остаток в СТ исходного GPCR, в частности исходного опсина, расположенный на 7-13 аминокислотных остатков, в частности на 8-12, или на 9-11, или на 10 аминокислотных остатков, ниже дистального конца мотива NR(K)Q;

D) он представляет собой аминокислотный остаток, который при выравнивании аминокислотных последовательностей исходного GPCR, в частности исходного опсина, с бычьим родопсином соответствует С322 или С323 бычьего родопсина.

Следует отметить, что данный последний критерий D относится к аминокислотным остаткам, расположенным на конце Н8, которые в действительности не являются пальмитоилированными, но соответствуют пальмитоилированным С322 и С323 родопсина при выравнивании аминокислотных последовательностей. Например, в обоих из опсинов колбочек человека hOPN1MW и hOPN1LW данные аминокислотные положения соответствуют аминокислотным остаткам G338 и K339.

Пальмитоилированный аминокислотный остаток на дистальном конце Н8, если он присутствует, благоприятно усиливает мембранную ассоциацию Н8. Соответственно, в химерных белках на основе опсина и GPCR, содержащих вышерасположенный опсин с одним или несколькими сайтами пальмитоилирования на дистальном конце Н8, в усеченном СТ вышерасположенного опсина наиболее предпочтительно сохраняется по меньшей мере один сайт пальмитоилирования. Соответственно, в данном тексте упоминаемый сайт усечения по сайту пальмитоилирования, который удовлетворяет вышеупомянутому критерию А или В, расположен смежно с дистальной стороны с сайтом пальмитоилирования, если не указано иное.

В данном тексте применительно к молекулам белков и нуклеиновых кислот термины "**нижерасположенный**" и "**дистальный**" относятся к С-концевому направлению или области в белках и 3'-направлению или области в молекулах нуклеиновых кислот, при этом термины "**вышерасположенный**" и "**проксимальный**" относятся к N-концевому направлению или области в белках и 5'-направлению или области в молекулах нуклеиновых кислот. Термины "ниже" и "дистально относительно", а

также соответственно термины "выше" и "проксимально относительно" используются взаимозаменяемо.

В данном тексте термины "**выше**" (или "**проксимально относительно**") домена, субдомена, области, мотива или сайта относятся к положению, которое находится выше (или проксимально относительно) проксимального конца указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта, в том числе к положению, которое является смежным с проксимальной стороны.

В данном тексте термины "**ниже**" (или "**дистально относительно**") домена, субдомена, области, мотива или сайта относятся к положению, которое находится ниже (или дистально относительно) дистального конца указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта, в том числе к положению, которое является смежным с дистальной стороны.

В данном тексте фраза "**в**" конкретном домене, субдомене, области, мотиве или сайте относится к положению в пределах указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта. В данном тексте фраза "**в или дистально относительно**" применительно к конкретному мотиву или сайту относится к положению, находящемуся в пределах указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта или дистально относительно них. С соответствующими изменениями то же самое применимо к фразам "в или ниже", "в или проксимально относительно" и "в или выше".

В данном тексте фраза **между двумя конкретными мотивами или сайтами**, такая как, например, фраза "между мотивом NR(K)Q и сайтом пальмитоилирования", если это явно не указано или не очевидно из контекста, подразумевает **включение** аминокислотных положений **в пределах данных мотивов или сайтов**, при условии, что они сохраняются или воссоздаются в их изначальной или функционально эквивалентной версии. Действительно, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления, включающих сайт сплайсинга между двумя консервативными мотивами или сайтами или между консервативным мотивом и другим аминокислотным положением, предпочтительный сайт сплайсинга может быть расположен в пределах консервативного мотива, и после завершения сплайсинговой манипуляции консервативный мотив или сайт или его функциональный эквивалент сохраняется или воссоздается.

В данном тексте фраза "**на проксимальном конце**" или "на верхнем конце" домена, субдомена, области, мотива или сайта включает положение на проксимальном (или верхнем) конце, которое все еще полностью или частично находится в пределах указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта на его проксимальном (или верхнем) конце или которое является смежным с проксимальной стороны с проксимальным (или верхним) концом указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта.

В данном тексте фраза "**на дистальном конце**" или "на нижнем конце" домена, субдомена, области, мотива или сайта аналогично включает положение на дистальном (или нижнем) конце, которое все еще полностью или частично находится в пределах

указанного домена, субдомена, области, мотива или сайта на его дистальном (или нижнем) конце или которое является смежным с дистальной стороны с указанным доменом, субдоменом, областью, мотивом или сайтом.

В данном тексте применительно к сигнальным путям "выше" и "ниже" относится к более ранним и более поздним стадиям сигнального пути или клеткам или компонентам, которые участвуют на более ранних и более поздних стадиях соответственно.

В данном тексте термин "**сайт сплайсинга (генов)**" и альтернативные или аналогичные термины, такие как сайт слияния (генов), сайт усечения или сайт разрезания и лигирования, относятся к сайту, в котором соединяются фрагменты генов различного происхождения, в частности, полученные из разных исходных GPCR.

Если не указано противоположное, в сайте сплайсинга генов (сайте слияния, сайте разрезания и лигирования, сайте усечения), который расположен в консервативном мотиве или сайте, по окончании манипуляции с генами сохраняются или воссоздаются те же или функционально эквивалентные мотив или конструкция, описанные выше. Даже если определено, что сайт сплайсинга расположен выше/проксимально относительно или ниже/дистально относительно конкретного мотива, сайта или аминокислотного положения, указанный сайт сплайсинга генов может располагаться в таком конкретном мотиве, сайте или аминокислотном положении или в его пределах, если в результате завершения манипуляции с генами (например, разрезания, лигирования, усечения, слияния, сплайсинга) консервативный мотив или аминокислота восстанавливаются или замещаются их функциональными производными, такими как описанные выше, включая, например, в некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислотную замену.

В данном тексте могут использоваться сокращения **G-белков** и их соответствующей субъединицы G-альфа, которые обычно соответствуют виду G(i/o) в случае G-альфа(i/o), или Ga(o) в случае G-альфа(o), или Ga(q) в случае G-альфа(q), как это общепринято в данной области техники.

В данном тексте термин "вариант" относится к полипептиду или кодирующему его гену, который отличается от эталонного полипептида, но сохраняет существенные свойства. Типичный вариант полипептида отличается по своей первичной аминокислотной последовательности от другого полипептида, используемого в качестве эталона. Как правило, различия ограничены, так что последовательности эталонного полипептида и варианта в целом весьма сходны и во многих областях идентичны. Вариант и эталонный полипептид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или несколькими модификациями (например, заменами, вставками и/или делециями). Вариант полипептида может быть встречающимся в природе, таким как аллельный вариант, или он может представлять собой вариант, о котором известно, что он не встречается в природе, т. е. вариант может быть сконструирован искусственным путем.

В данном тексте фразы "**процент идентичности последовательностей**", "**процент идентичности с**", "**процент сходства с**" применительно к аминокислотной

последовательности описывают количество совпадений идентичных аминокислот в двух или более выровненных аминокислотных последовательностях по сравнению с количеством аминокислотных остатков в аминокислотных последовательностях полной длины. Таким образом, с помощью выравнивания в случае с двумя или более последовательностями можно определить процентную долю одинаковых аминокислотных остатков (такую как, например, 90%, или 95%, или 100% идентичность по всей длине аминокислотных последовательностей) при сравнении последовательностей и их выравнивании для максимального соответствия, измеряемого с помощью алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области техники, или, в частности в случае с короткими мотивами последовательностей, при выравнивании вручную и визуальном осмотре. Так, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут различаться заменой(заменами), добавлением(добавлениями) или делецией(делециями) аминокислот. Подходящие программы для выравнивания последовательностей белков известны из уровня техники.

Выравнивание последовательностей для сравнения можно произвести, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма глобального выравнивания Нидлмана-Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства Пирсона-Липмана, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85:2444 (1988), или с помощью компьютеризированных реализаций данных алгоритмов, в том числе без ограничения следующих: CLUSTAL, например, CLUSTALW, Clustal Omega, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным, например, благодаря Национальному центру биотехнологической информации (алгоритм BLAST от NCBI (Altschul SF, et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)). Одним таким примером сравнения последовательностей нуклеиновых кислот является алгоритм BLASTN, в котором используются настройки по умолчанию: ожидаемый порог: 10; размер слова: 28; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; баллы за совпадение/несовпадение: 1-2; стоимость гэпов: линейная. Если не указано иное, приведенные в данном документе значения идентичности последовательностей относятся к значению, полученному с применением пакета программ BLAST (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)) с использованием указанных выше 35 параметров по умолчанию для сравнения белков и нуклеиновых кислот соответственно.

В данном тексте термин "консервативная аминокислотная замена" относится к модификациям, которые являются физически, биологически, химически или функционально сходными с соответствующим эталоном, например, к сходному размеру, форме, электрическому заряду, химическим свойствам, в том числе способности образовывать ковалентные или водородные связи, или т. п.

Например, консервативные аминокислотные замены включают замены, при которых аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей, например, треонин может быть заменен на серин.

Аминокислотные остатки обычно на основании общих сходных свойств боковых цепей подразделяются на семейства, такие как:

1. неполярные боковые цепи (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин),
2. незаряженные полярные боковые цепи (например, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, пролин, цистеин, триптофан),
3. основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин, пролин),
4. кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота),
5. бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и
6. ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Консервативная замена может также предусматривать применение неприродной аминокислоты.

В данном тексте термин "сходные последовательности белков" означает последовательности, которые при выравнивании имеют сходные аминокислотные остатки и чаще всего идентичные аминокислотные остатки в соответствующих положениях сравниваемых последовательностей. Сходные аминокислотные остатки группируются по химическим характеристикам боковых цепей в семейства. Указанные семейства описаны выше для "консервативных аминокислотных замен". "Процент сходства" между последовательностями представляет собой количество положений, которые содержат идентичные или сходные остатки в соответствующих положениях последовательностей в сравниваемых последовательностях, деленное на общее количество сравниваемых положений и умноженное на 100%. Например, если 6 из 10 положений последовательности имеют идентичные аминокислотные остатки, и 2 из 10 положений содержат сходные остатки, то последовательности характеризуются 80% сходством. Сходство между двумя последовательностями можно, например, определить с помощью EMBOSS Needle.

В данном тексте проксимальная область СТ опсина называется **проксимальной областью О-СТ** и определяется как содержащая мотив NR(K)Q и следующие за ним примерно 10 аминокислот, в частности 7-13, более конкретно 8-12 или наиболее конкретно 9-11 аминокислот в дистальном направлении, которые зачастую включают спираль 8 (H8). Проксимальная область СТ опсина необязательно содержит сайт пальмитоилирования (С) на дистальном конце H8.

В данном тексте термин "**усеченный СТ опсина**" относится к усеченному СТ вышерасположенного опсина, который усечен по **сайту усечения**, за пределами которого в дистальном направлении аминокислоты СТ исходного вышерасположенного опсина исключены из усеченного СТ опсина. Сайт усечения в усеченном СТ расположен в аминокислотном положении на дистальном конце проксимальной области О-СТ или дистально относительно него, в частности на дистальном конце дистального удлинения проксимальной области О-СТ, как определено выше.

В предпочтительных вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR сайт усеечения в усеченном СТ опсина расположен на дистальном конце проксимальной области СТ вышерасположенного опсина (проксимальной области О-СТ).

Однако, некоторые варианты осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR содержат сайт усеечения в СТ вышерасположенного опсина на дистальном конце **дистального удлинения проксимальной области О-СТ**. Дистальное удлинение проксимальной области О-СТ содержит дистальный конец на расстоянии до 5, или до 10, или до 16, или до 22, или до 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот ниже дистального конца проксимальной области О-СТ или, в частности, ниже сайта пальмитоилирования.

В некоторых вариантах осуществления сайт усеечения СТ опсина выбран в положении на расстоянии до 41, или до 43, или до 45, или до 47 аминокислот ниже мотива NR(K)Q.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, предусматривающих дистальное удлинение проксимальной области О-СТ, вышерасположенный опсин выбран из группы меланопсинов.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривающих дистальное удлинение проксимальной области О-СТ, вышерасположенный опсин содержит длинный домен СТ, например, он содержит СТ с по меньшей мере 50, 65, 80, 100, 150 или 200 аминокислотами.

В некоторых из этих и других вариантов осуществления с дистальным удлинением проксимальной области О-СТ дистальный конец дистального удлинения выбран так, чтобы были исключены субдомены СТ вышерасположенного опсина, которые влияют на внутриклеточную транспортировку и кинетические свойства, специфичные для вышерасположенного опсина.

Необычно длинная С-концевая цитоплазматическая область меланопсина (AA364-521 в мышинном OPN4) демонстрирует ограниченную гомологию с другими GPCR. Следовательно, это может вносить вклад в характерные свойства ответа у меланопсина, который суммирует входящий поток информации во времени, являясь детектором окружающего света, определяющим ритм биологических часов. Было высказано предположение, что AA381-397 мышинного Opn4, которые являются высококонсервативными среди меланопсинов у различных видов, играют важную роль в формировании ответа у фотоактивируемого меланопсина (Mure et al. 2016). Поэтому для ускорения кинетики его ответа некоторые варианты осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR с меланопсином в качестве вышерасположенного опсина содержат меланопсин, усеченный по аминокислотному положению 397 мышинного меланопсина или дистально относительно него. Аминокислотное положение 397 соответствует положению на 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования, расположенного в аминокислотном положении 364 в мышинном меланопсине.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе

опсина и GPCR, где опсин представляет собой меланопсин, усеченный СТ опсина содержит до примерно 44 аминокислот ниже дистального конца мотива NR(K)Q, что соответствует до примерно 33 аминокислот ниже сайта пальмитоилирования.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина содержит весь вышерасположенный опсин вплоть до сайта усечения, или часть из вышерасположенного опсина содержит непрерывную область вышерасположенного опсина от мотива E(DRY) вплоть до сайта усечения, или часть из вышерасположенного опсина содержит TM3, TM4, TM5, TM6 и TM7 и необязательно усеченный СТ вышерасположенного опсина вплоть до сайта усечения.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина содержит трансмембранные домены TM3 и TM7, в частности содержит трансмембранные домены TM3-TM7, TM2-TM7 или содержит TM1-TM7.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина дополнительно содержит один или несколько внеклеточных доменов, выбранных из EL1, EL2, EL3 и NT.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина получена из двух или более исходных опсинов, в частности из двух исходных опсинов.

В некоторых вариантах осуществления часть из вышерасположенного опсина содержит трансмембранные домены, полученные из исходного опсина, который является опсином, отличным от человеческого, и дополнительно содержит один или несколько, в частности два или три, или все внеклеточные домены, полученные из исходного опсина, который является человеческим опсином. В этих вариантах осуществления иммунная система человека преимущественно не распознает в качестве чужеродных эпитопов внеклеточные домены, полученные из человеческого опсина. Соответственно, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления белка на основе опсина и GPCR все внеклеточные домены получены из человеческого опсина.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR TM7 и усеченный СТ опсина получены из одного и того же исходного опсина.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина содержит все внеклеточные домены, все трансмембранные домены и все внутриклеточные петли.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина содержит весь исходный вышерасположенный опсин вплоть до сайта усечения в СТ.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина получена из моностабильного или бистабильного опсина или из тристабильного опсина, в частности из бистабильного опсина.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR

часть из вышерасположенного опсина получена из исходного опсина, выбранного из группы опсинов, включающей:

- меланопсин (OPN4);
- родопсин (RHO);
- опсины колбочек (OPN1SW, OPN1LW и OPN1MW);
- опсин медузы (CubOP, JellyOP);
- родопсин паука-скакуна (JSR1);
- парапинопсин (PPO);
- нейропсин (OPN5);
- энцефалопсин (OPN3).

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR в части из вышерасположенного опсина химерного белка на основе опсина и GPCR по сравнению с физиологическим исходным опсином присутствуют делеции или добавления, в частности делеции или добавления до 5, или до 10, или до 15, или до 20, или до 30 аминокислот. В некоторых из этих и других вариантов осуществления в части из вышерасположенного опсина химерного белка на основе опсина и GPCR по сравнению с физиологическим исходным опсином присутствуют замены аминокислот, в частности консервативные замены аминокислот и/или в частности до 5, или до 10, или до 15 или 20 замененных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR аминокислотная последовательность части из вышерасположенного опсина на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, в частности полностью, идентична соответствующей части физиологического одного или нескольких исходных опсинов или сходна с ней.

В данном тексте термин **"СТ целевого GPCR"** или **"целевой СТ"** для краткости относится к фактически полному СТ целевого GPCR или к его функционально активному варианту. Функционально активные варианты целевого СТ способны со сходной эффективностью обеспечивать сопряжение активации химерного белка на основе опсина и GPCR или исходного целевого GPCR со специфическим сигнальным путем исходного GPCR.

Представлен химерный белок на основе опсина и GPCR согласно одному из предыдущих пунктов формулы изобретения, содержащий целевой GPCR, характеризующийся, в частности, делецией одной или нескольких аминокислот, в частности N-концевой делецией, между мотивом NPxxY и любым аминокислотным положением вплоть до сайта пальмитоилирования или вплоть до аминокислотного положения, смежного с проксимальной стороны с сайтом пальмитоилирования.

В некоторых вариантах осуществления СТ целевого GPCR является фактически полным. В частности, фактически полный целевой GPCR содержит проксимальный конец в сайтах NPxxY и NR(K)Q или между ними. В некоторых вариантах осуществления СТ целевого GPCR имеет проксимальный конец на одну аминокислоту, или до 2, или до 3,

или до 4, или до 5 аминокислот ниже сайта NR(K)Q. В некоторых вариантах осуществления целевой СТ имеет проксимальный конец между сайтом NR(K)Q и дистальным концом проксимальной области целевого СТ, который находится на около 7-13, или 8-12, или 9-11, или примерно 10 аминокислот дистальнее сайта NR(K)Q или, в частности, в сайте пальмитоилирования или в аминокислотном положении, соответствующем сайту пальмитоилирования, определенном выше.

В некоторых вариантах осуществления с функциональным вариантом СТ исходного целевого GPCR одна или несколько аминокислот, которые расположены между мотивом NPxxY на дистальном конце TM7 целевого GPCR и мотивом NR(K)Q на проксимальном конце H8 СТ целевого GPCR, подвергнуты делеции или заменены.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления с функциональным вариантом исходного целевого GPCR проксимальная область целевого GPCR подвергнута делеции вплоть до сайта пальмитоилирования на дистальном конце H8. Так, в этих вариантах осуществления или в некоторых дополнительных вариантах осуществления с целевыми СТ, которые не содержат H8, мотив NR(K)Q и последующие 7-13, или 8-12, или 9-11 аминокислот целевого GPCR подвергнуты делеции. В конкретных вариантах осуществления аминокислоты, проксимальные относительно сайта пальмитоилирования или сайта, соответствующего сайту пальмитоилирования, определенного выше, подвергнуты делеции.

В некоторых из этих вариантов осуществления такой функциональный СТ целевого GPCR и усеченный СТ опсина совместно подвергнуты сплайсингу в сайтах пальмитоилирования.

В некоторых вариантах осуществления функционального варианта СТ, содержащего замены и/или делеции, консервативный мотив NR(K)Q сохраняется нетронутым.

В некоторых вариантах осуществления с функциональным вариантом СТ исходного целевого GPCR аминокислотная последовательность СТ целевого GPCR в целевой GPCR-части химерного белка на основе опсина и GPCR на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% идентична СТ физиологического исходного целевого GPCR или сходна с ним.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевая GPCR-часть получена из отличного от опсинового GPCR. В некоторых других вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевая GPCR-часть получена из опсина.

Так, некоторые варианты осуществления содержат два опсина: вышерасположенный опсин и нижерасположенный опсин, который называется целевым опсином.

Часть из вышерасположенного опсина является светоактивируемой и обеспечивает

сопряжения световой активации с СТ целевого GPCR. Целевой опсин осуществляет сопряжение световой активации с сигнальным каскадом целевого опсина посредством связывания с белком G-альфа, физиологически соответствующим целевому опсину.

В усеченный СТ вышерасположенного опсина встроена проксимальная область О-СТ. Некоторые варианты осуществления, содержащие вышерасположенный опсин и целевой опсин, содержат две проксимальные области О-СТ, при этом одна из них получена из вышерасположенного опсина, и одна получена из целевого GPCR. Эти варианты осуществления также могут содержать два субдомена Н8 СТ опсина - Н8 вышерасположенного опсина и Н8 целевого GPCR.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевая СТ-часть получена из исходного целевого GPCR, выбранного из группы белков GPCR, включающей:

GPCR класса А, в частности выбранные из группы, включающей:

- опсины колбочек, в частности OPN1SW, OPN1MW или OPN1LW,
- серотониновые рецепторы, в частности 5-HT7,
- мю-опиоидный рецептор,
- β-адренергический рецептор, в частности бета-1-адренорецептор, бета-2-адренорецептор и бета-3-адренорецептор;

GPCR класса В, в частности выбранные из группы, включающей:

- рецепторы гормонов, в частности рецептор глюкагона (GCGR);

GPCR класса С, в частности выбранные из группы, включающей:

- рецепторы GABA_B, в частности GABA_{B1} и GABA_{B2};
- метаботропные глутаматные рецепторы, в частности рецепторы mGluR6 и mGluR5.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевой GPCR представляет собой GPCR класса А, или GPCR класса В, или GPCR другого класса, за исключением GPCR класса С. В некоторых из этих вариантов осуществления целевая GPCR-часть содержит одну или несколько внутриклеточных петель, выбранных из П1, П2 и П3.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевой GPCR представляет собой GPCR класса С, в частности mGluR6. В некоторых из этих вариантов осуществления целевая GPCR-часть класса С, в частности mGluR6-часть, содержит одну или несколько внутриклеточных петель, выбранных из П1, П2 и П3, при условии, что удовлетворяется один из следующих критериев:

А: в химерном GPCR исключено одновременное присутствие П3 природного размера, содержащейся в части из вышерасположенного опсина, и П2 природного размера из GPCR класса С в положениях, соответствующих их нативному положению, чтобы избежать стерических затруднений между этими двумя П в химерном GPCR;

В: часть из вышерасположенного опсина содержит все внутриклеточные петли П1-П3;

C: часть из вышерасположенного опсина содержит IL1, а целевая GPCR-часть содержит как IL2, так и IL3, которые замещают IL2 и IL3 вышерасположенного опсина в соответствующих положениях.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR СТ химерного белка на основе опсина и GPCR дополнительно содержит элемент последовательности, выбранный из следующей группы элементов:

- сигнала экспорта из аппарата Гольджи;
- последовательности для мембранной транспортировки;
- элемента последовательности, кодирующего флуоресцентный белок.

Один или несколько выбранных элементов расположены независимо в любом порядке на С-конце СТ химерного белка на основе опсина и GPCR.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR СТ химерного белка на основе опсина и GPCR содержит в качестве выбранного элемента последовательности сигнал экспорта, в частности сигнал экспорта из эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи, в частности сигнал экспорта из аппарата Гольджи калиевого канала Kir2.1 с аминокислотной последовательностью KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 85) или сигнал экспорта из ER Kir2.1 с аминокислотной последовательностью FCYENEV (SEQ ID NO: 86).

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR СТ химерного белка на основе опсина и GPCR содержит в качестве выбранного элемента последовательности последовательность для мембранной транспортировки, в частности из опсина, более конкретно аминокислотную последовательность ETSQVAPA (SEQ ID NO: 53), которая также называется эпитопной меткой 1D4 или для краткости меткой 1D4 (см. также Gross et al. 2009; Lodowski et al. 2013).

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR СТ химерного белка на основе опсина и GPCR содержит элемент последовательности, кодирующий флуоресцентный белок, в частности, выбранный из mKate2, TurboFP635 или mScarlet. В некоторых из этих вариантов осуществления флуоресцентный белок непосредственно слит с СТ химерного белка на основе опсина и GPCR, а в некоторых других из этих вариантов осуществления флуоресцентный белок связан посредством последовательности IRES или T2A.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевая GPCR-часть дополнительно содержит IL1, и IL1 целевого GPCR замещает IL1 вышерасположенного опсина.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR IL3 вышерасположенного опсина замещена IL3 целевого GPCR. В некоторых других вариантах осуществления переменная область в IL3 вышерасположенного опсина замещена IL3 целевого GPCR. Таким образом, получают образуемую химерную IL3, содержащую всю IL3 целевого GPCR в положении, замещающем переменную область в IL3 опсина. В химерной IL3 сохранены части IL3 вышерасположенного опсина, которые

являются смежными с проксимальной и дистальной стороны с вариабельной областью IL3 вышерасположенного опсина.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR, в частности с mGluR6 в качестве целевого GPCR, проксимальный конец целевого СТ расположен в мотиве NR(K)Q или выше него или в сайте пальмитоилирования.

С-концы mGluR и их взаимодействие с партнерами по связыванию хорошо изучены (см. также, например, Enz R, 2012). В mGluR6 аминокислоты HPE составляют мотив NR(K)Q.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевой GPCR представляет собой mGluR6, а IL3 mGluR6 частично замещает вариабельную область IL3 опсина, за счет чего образуется химерная IL3 опсина/mGluR6. Соответственно, эти варианты осуществления помимо химерного СТ содержат химерную IL3.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевой GPCR представляет собой mGluR6, а часть из вышерасположенного опсина дополнительно содержит одну или несколько внутриклеточных петель, выбранных из IL1, IL2 и IL3, при условии, что исключено одновременное присутствие IL3 природного размера, содержащейся в части из вышерасположенного опсина, и IL2 природного размера, содержащейся в mGluR6-части, в химерном белке на основе опсина и mGluR6.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина получена из меланопсина и содержит NT, EL1-EL3, TM1-TM7, IL1 и усеченный СТ опсина, а целевая GPCR-часть получена из mGluR6 либо из hOPN1mw и содержит IL2, IL3 и СТ.

Некоторые варианты осуществления белка на основе опсина и GPCR содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44, или состоят из нее. Некоторые из этих последовательностей содержат добавленную на С-конце последовательность, выбранную из сигнала экспорта из аппарата Гольджи и/или метки 1D4. Как сигнал экспорта из аппарата Гольджи, так и метка 1D4 являются необязательными. Соответственно, последовательность согласно любому из вышеупомянутых SEQ ID NO, которая содержит сигнал экспорта из аппарата Гольджи и/или метку 1D4, определяется как включающая варианты, в которых одна или обе необязательные добавленные на С-конце последовательности отсутствуют.

Некоторые особенно предпочтительные варианты осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28, или состоят из нее.

Некоторые варианты осуществления белка на основе опсина и GPCR содержат аминокислотную последовательность, которая представляет собой вариант любой из последовательностей с вышеупомянутым SEQ ID NO, содержащий одно или несколько видоизменений, выбранных из:

- консервативной аминокислотной замены,
- делеции в диапазоне от 1 до 3 или до 5, до 8 или до 15 аминокислот,
- вставки в диапазоне от 1 до 3 или до 5, до 8 или до 15 аминокислот, и

где химерный белок на основе опсина и GPCR демонстрирует зависимое от световой активации связывание белка G-альфа, специфичного к целевому GPCR. В некоторых из этих вариантов осуществления целевой GPCR представляет собой mGluR6, а химерный белок на основе опсина и mGluR6 при световой активации связывает G-альфа(о).

Некоторые варианты осуществления белка на основе опсина и GPCR, содержат аминокислотную последовательность, которая представляет собой вариант любой из последовательностей с вышеупомянутым SEQ ID NO, где указанная последовательность характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR целевая GPCR-часть содержит фактически полный СТ с проксимальным концом между сайтами NPxxY и NR(K)Q или состоит из него. В особенно предпочтительных вариантах осуществления целевая GPCR-часть получена из mGluR6 или из второго опсина (целевого опсина), в частности из опсина колбочек или из родопсина.

В некоторых из этих и других предпочтительных вариантов осуществления сайт усечения СТ вышерасположенного опсина расположен в сайте пальмитоилирования или в аминокислотном положении, соответствующем сайту пальмитоилирования, определенном выше. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сайт усечения СТ вышерасположенного опсина расположен дистально относительно сайта пальмитоилирования, например, на расстоянии до 5, или до 10, или до 33 аминокислот дистально относительно сайта пальмитоилирования.

В некоторых из этих и других предпочтительных вариантов осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR часть из вышерасположенного опсина содержит весь вышерасположенный опсин вплоть до сайта усечения в СТ.

В некоторых из этих и других предпочтительных вариантов осуществления, в частности, если в них содержится вышерасположенный опсин нечеловеческого происхождения, необязательно один, или некоторые, или все внеклеточные домены заменены внеклеточными доменами человеческого опсина. Необязательно в некоторых из этих предпочтительных и других вариантов осуществления дополнительно или в качестве альтернативы одна или несколько внутриклеточных петель, выбранных из IL1, IL2 и IL3,

заменены на IL, полученную из целевого GPCR, в частности IL1 или IL3 либо часть IL3, как описано выше.

В некоторых из этих и других предпочтительных вариантов осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR вышерасположенный опсин выбран из группы, включающей меланопсин, опсин колбочек, в частности опсин средневолновых колбочек, опсин кубомедузы, или парапинопсин, или родопсин паука-скакуна (JSR1 или hJSR(S186F)).

Некоторые из этих и других предпочтительных вариантов осуществления включают меланопсин в качестве вышерасположенного опсина и mGluR6 в качестве целевого опсина и для краткости называются mela-mGluR6. В особенно предпочтительных вариантах осуществления mela-mGluR6, которые называются mela(palm)-mGluR6, меланопсин усечен по своему сайту пальмитоилирования на дистальном конце H8 и слит с фактически полным СТ mGluR6. Некоторые наиболее предпочтительные варианты осуществления химерной молекулы mela(palm)-mGluR6 содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28 или их вариант, или состоят из нее.

Как описано выше, химерный белок на основе опсина и GPCR по настоящему изобретению демонстрирует общую 3D-структуру белков GPCR. Химерный белок на основе опсина и GPCR дополнительно содержит консервативные мотивы, характерные для всех белков GPCR, такие как ионный замок с мотивом E(D)RY, мотив NPxxY, мотив NR(K)Q. Химерный белок GPCR согласно настоящему изобретению содержит часть из вышерасположенного опсина и целевую GPCR-часть.

Часть из вышерасположенного опсина также для краткости называется опсиновой частью в вариантах осуществления, где целевой GPCR представляет собой отличный от опсинового GPCR. Часть из вышерасположенного опсина содержит хромофорный карман и содержит усеченный СТ опсина, который содержит проксимальную область O-СТ, необязательно с дистальным удлинением.

Проксимальная область O-СТ содержит мотив NR(K)Q и следующие за ним примерно 10 аминокислот в дистальном направлении, которые во многих вариантах осуществления образуют H8, необязательно с одним или несколькими сайтами пальмитоилирования на ее дистальном конце. В некоторых вариантах осуществления проксимальная область O-СТ содержит проксимальное удлинение до сайта NPxxY и/или дистальное удлинение до положения на примерно 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования, что соответствует положению на до примерно 44 аминокислот ниже мотива NR(K)Q.

Целевая GPCR-часть содержит фактически весь СТ целевого GPCR или его функциональный вариант, в частности его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления целевой GPCR представляет собой дополнительный опсин.

В некоторых вариантах осуществления химерный белок на основе опсина и GPCR

содержит две спирали H8: одну в усеченном СТ опсина и одну в СТ целевого GPCR.

Было обнаружено, что проксимальная область О-СТ исходного вышерасположенного опсина благоприятно повышает конформационную стабильность и функцию световой активации у части из вышерасположенного опсина в химерном белке на основе опсина и GPCR.

Целевой GPCR или его функциональный вариант, в частности его функциональный фрагмент, благоприятно опосредует надлежащую субклеточную транспортировку белка, в том числе транспортировку к клеточной мембране. Дополнительно предполагается, что надлежащая транспортировка химерного белка на основе опсина и GPCR к клеточной мембране усиливает как ответ на световую активацию, так и сдвиг селективности связывания G-белка от белка G-альфа для исходного опсина к белку G-альфа для целевого GPCR.

Таким образом, именно химерный СТ, содержащий проксимальную область О-СТ и целевой СТ, приводит к получению неожиданных технических эффектов: его одного достаточно для трансформации вышерасположенного опсина так, чтобы он обеспечивал сопряжение световой активации химерного белка на основе опсина и GPCR с эндогенной сигналомомой клеток, являющихся терапевтическими мишенями, путем связывания с белком G-альфа для целевого GPCR.

В некоторых вариантах осуществления химерный белок GPCR содержит часть из вышерасположенного опсина опсиновую часть и mGluR6-часть. Опсиновая часть содержит хромофорный карман и усеченный СТ опсина, содержащий мотив NR(K)Q и H8, а также необязательно один или несколько сайтов пальмитоилирования и/или необязательно до примерно 33 аминокислот ниже сайта пальмитоилирования или до примерно 44 аминокислот ниже мотива NR(K)Q. mGluR6-часть содержит фактически весь СТ mGluR6 или его функциональный вариант, в частности его функциональный фрагмент. Химерный белок на основе опсина и GPCR с mGluR6 согласно этим вариантам осуществления имеет химерный СТ с усеченным СТ опсина выше СТ mGluR6. В некоторых вариантах осуществления он содержит две спирали H8: одну в усеченном СТ опсина и одну в СТ целевого GPCR.

Химерного СТ достаточно для нацеливания иллюстративного химерного белка на основе опсина и mGluR6 на сигналомому ON-биполярных клеток, где при световой активации он связывается с белком G-альфа(о) вместо другого G-белка сигналомомы, который является эндогенным в физиологическом клеточном окружении исходного меланопсина.

В некоторых вариантах осуществления химерной молекулы на основе опсина и mGluR6 опсин представляет собой меланопсин.

Иллюстративные варианты осуществления химерных белков на основе меланопсина и GPCR, содержащих химерный СТ, содержащий усеченный СТ меланопсина и нативный СТ целевого GPCR, преимущественно демонстрируют гораздо более быстрый ответ на свет, чем исходный меланопсин. Это действительно желательно с

учетом того, что кинетика ответа меланопсина адаптирована к его физиологической роли в регуляции циркадного ритма - процесса, при котором необходима более медленная кинетика ответа на изменение света, чем кинетика ответа, необходимая для зрения.

Наблюдалось, что химерные белки на основе опсина и GluR6 обеспечивают сопряжение световой активации с сигнальным каскадом mGluR6 с эффективностью, сходной с эффективностью обеспечиваемого физиологическими исходными опсинами сопряжения световой активации со своим сигнальным каскадом в здоровых фоторецепторных клетках.

Таким образом, генетическая трансформация физиологически нечувствительных к свету нейронов, в частности ON-биполярных клеток, молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими химерный белок на основе опсина и GPCR GluR6, позволяет миновать фоторецепторные клетки в зрительном сигнальном пути и позволяет восстановить зрение в образцах сетчатки с дегенерированными фоторецепторными клетками путем превращения ON-биполярных клеток в "замещающие фоторецепторы", которые могут активировать нейроны сетчатки.

В предшествующем уровне техники, например, как в случае с вышеупомянутыми химерными белками на основе опсина и mGluR6, данная терапевтическая концепция ранее хорошо зарекомендовала себя. В настоящем изобретении очень неожиданным стало то, что достаточно просто снабдить физиологический опсин генно-инженерным химерным СТ, содержащим проксимальную область О-СТ, в частности, встроенную в усеченный СТ опсина, и фактически полный СТ целевого GPCR. Вдобавок, такая генетическая конструкция применима ко всем тестируемым химерным молекулам на основе опсина и GPCR.

В отличие от этого, в предшествующем уровне техники изложено, что, помимо СТ, для селективности в отношении G-белка особенно важными или даже необходимыми оказываются внутриклеточные петли, в частности IL3, а также IL2 (WO2012/174674, Kleinlogel, 2016; Tsai et al, 2018).

Таким образом, специфичное связывание G-альфа(о) сигнасомы mGluR6 химерным белком на основе опсина и mGluR6 по настоящему изобретению неожиданно достигается при полном отсутствии каких-либо внутриклеточных петель mGluR6.

Действительно, иллюстративные химерные белки на основе опсина и GPCR mGluR6, содержащие только химерный СТ и не содержащие дополнительных внутриклеточных доменов mGluR6, имитируют или превосходят химерные белки на основе опсина и GPCR из предшествующего уровня техники, содержащие дополнительное замещение внутриклеточных петель, по благоприятным свойствам, таким как, например, быстрая кинетика и амплитуда ответа на световую активацию или, например, надлежащая внутриклеточная транспортировка в субклеточный компартмент, соответствующий физиологическому компартменту клеток, содержащих исходный целевой GPCR. Например, химерные белки на основе опсина и GPCR mGluR6 по настоящему изобретению более эффективно нацеливаются на дендриты в ON-биполярных

клетках и усиливают светоиндуцированные ответы сетчатки по сравнению с химерными Opto-mGluR6, доступными в предшествующем уровне техники (van Wyk et al, 2015).

Особым преимуществом химерного белка на основе опсина и GPCR с химерным СТ или СТ целевого опсина согласно настоящему изобретению является значительная простота при разработке, для которой необходимы минимальные моделирование *in silico* и геновая инженерия, основанные лишь на выборе единственного обязательного сайта сплайсинга. Тем не менее, функциональный ответ на световую активацию химерных белков на основе опсина и GPCR, таких как, например, химерный белок на основе опсина и mGluR6 или химерный белок на основе опсина и 5-гидрокситриптаминового рецептора 7 (5-HT7), даже соответствует по величине и скорости физиологическому ответу исходных целевых GPCR.

Первый аспект настоящего изобретения дополнительно относится к пептиду, содержащему химерный С-концевой домен (химерный СТ), полученный из СТ исходного опсина и СТ исходного целевого GPCR, в частности содержащему химерный С-концевой домен (химерный СТ) описанного выше химерного белка на основе опсина и GPCR. Химерный С-концевой пептид содержит усеченный С-концевой домен вышерасположенного опсина (усеченный СТ опсина), в том числе проксимальную область СТ (проксимальную область О-СТ). Проксимальная область О-СТ, в частности, содержит спираль 8 (H8) и сайт пальмитоилирования, соответствующий С322 или С323 соответственно бычьего родопсина. В некоторых вариантах осуществления проксимальная область О-СТ содержит дистальное удлинение, например, до положения на примерно 33, 34 или 35 аминокислот ниже сайта пальмитоилирования опсина. Пептид дополнительно содержит С-концевой домен целевого GPCR (СТ целевого GPCR) или его функциональный вариант, в частности функциональный фрагмент. СТ целевого GPCR расположен ниже усеченного СТ опсина.

Второй аспект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR и кодирующей химерный С-концевой пептид, содержащий усеченный СТ опсина и СТ целевого GPCR или его функциональный вариант. Указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR, или состоит из нее.

Химерный белок на основе опсина и GPCR и химерный С-концевой пептид, а также последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие их, являются продуктами слияния генов, также называемыми продуктами сплайсинга генов, содержащими фрагменты исходного гена, кодирующие исходный вышерасположенный опсин, и фрагменты исходного гена, кодирующие исходный целевой GPCR, которые описаны выше.

В данном тексте последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный белок на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид, также называется химерным геном опсина/GPCR или химерным трансгеном опсина/GPCR.

В данном тексте термин "трансген" относится к гену или молекуле нуклеиновой кислоты, перенесенным в геном организма или клетки. В частности, термин "трансген" относится к гену или молекуле нуклеиновой кислоты, которые кодируют химерные белки на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид по настоящему изобретению.

В данном тексте термины "химерный белок на основе опсина и GPCR" и "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный химерный белок на основе опсина и GPCR" относятся к белку и молекуле нуклеиновой кислоты, которые как таковые не встречаются в природе. Скорее, они являются искусственными молекулами, которые можно получить с помощью таких молекулярных методик, как, например, клонирование генов, экспрессия генов, технология рекомбинантных нуклеиновых кислот, химический синтез, такой как, например, твердофазный химический синтез рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот. Их можно обрабатывать, изготавливать и производить с ними манипуляции также и другими способами, известными в данной области техники. В отношении стандартных методик, применяемых для молекулярных, генетических и биохимических способов, а также химических способов, см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.

Таким образом, второй аспект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или состоящей из нее.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты она содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из группы аминокислотных последовательностей, включающей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44, как, например, на по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44.

Примеры таких последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих химерный белок на основе опсина и GPCR, состоящий из аминокислотной

последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44, включают без ограничения последовательность нуклеиновой кислоты, идентичную последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный белок на основе опсина и GPCR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43; как, например, на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43, или состоит из нее.

В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления представлена молекула нуклеиновой кислоты согласно пункту 38 формулы изобретения, кодирующая предпочтительный химерный белок на основе опсина и GPCR *mela(palm)-mGluR6*, где указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или состоит из нее.

Третий аспект настоящего изобретения относится к полипептиду капсида аденоассоциированного вируса (капсида AAV) для медицинского применения доставки молекулы нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения в клетку-мишень. Таким образом, третий аспект предусматривает капсид AAV для переноса трансгена, кодирующего химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту, в клетку-мишень. Третий аспект также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую капсидный полипептид AAV для указанного медицинского применения.

Второе изобретение, независимое от основного изобретения, описанного в данном документе, в аспекте А относится к новому капсидному полипептиду AAV как таковому, а в аспекте В - к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую указанный новый капсид AAV.

Аспект С независимого второго изобретения относится к новому капсидному полипептиду AAV и кодирующей его молекуле нуклеиновой кислоты для медицинского применения доставки трансгена в клетку-мишень. Аспект С независимого второго изобретения также включает новый капсидный полипептид AAV и кодирующую его молекулу нуклеиновой кислоты для медицинского применения доставки молекул нуклеиновых кислот, кодирующих химерный белок на основе опсина и GPCR, согласно второму и первому аспектам соответственно первого, основного, изобретения в клетку-мишень.

Аспект D независимого второго изобретения относится к вектору на основе рекомбинантного AAV, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно аспекту В, кодирующую новый капсид согласно аспекту А независимого второго изобретения.

В описании и представленной ниже формуле изобретения термин "капсид AAV" или "капсид" относится как к капсиду для медицинского применения согласно основному изобретению, так и к капсиду как таковому согласно независимому второму изобретению, если иное не очевидно из контекста.

Соответственно, в третьем аспекте настоящего изобретения полипептид капсида аденоассоциированного вируса (AAV) и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный полипептид AAV, предусмотрены для применения в медицинской терапии для доставки молекулы нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения, в клетку-мишень.

В некоторых вариантах осуществления капсид представляет собой капсидный белок AAV2 AAV2(7m8) (Dalkara D et al, 2013) или AAV8(BP2) (Cronin et al, 2014) или вариант, полученный из него.

У AAV дикого типа геном содержит ген Сар, который кодирует капсидные белки VP1, VP2 и VP3, которые взаимодействуют друг с другом с образованием капсида икосаэдрической симметрии, и белок, активирующий сборку (AAP), который необходим для стабилизации и транспортировки новообразованных белков VP из цитоплазмы в ядро клетки. Все три VP транслируются из одной мРНК и сплайсируются по-разному. Самый большой VP1 размером 90 кДа представляет собой нессплайсированный транскрипт, VP2 размером 72 кДа транслируется из нетрадиционного стартового кодона ACG, тогда как самый маленький VP3 размером 60 кДа транслируется из кодона AUG. Все три VP имеют перекрывающиеся С-концы.

Ссылка на аминокислотное положение в капсиде AAV применительно к настоящему тексту относится к аминокислотной последовательности капсидного белка VP1 AAV2 в соответствии с эталонной последовательностью AAV2, доступной в GenBank

под № записи J01901.1 (аденоассоциированный вирус серотипа 2, полный геном).

В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит пептидную вставку. В некоторых вариантах осуществления пептид вставлен, в частности, в пик или шипообразный выступ.

Пептид вставлен в положение 587 капсида AAV2. Шипообразные выступы (пики) отображают наиболее открытые области капсидов. Наиболее высокий пик расположен в аминокислотном положении 453, а второй по высоте - в положении 587 в капсиде AAV2. Эти пики принимают пептидные вставки, не нарушая сборку капсида, и обеспечивают возможности для нацеливания на непермиссивные клетки. Подобным образом, выступы представляют собой критически важные участки взаимодействия AAV с хозяином, связывания рецепторов и иммуногенности.

Последовательность капсида AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 59) показана ниже с точкой вставки вышеупомянутых пептидов между N587 и R588, которые выделены жирным шрифтом и подчеркиванием.

```

MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD 60
KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120
AKKRVLEPLG LVEEFPVKTAP GKKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD 180
SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI 240
TTSTRITWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI 300
NNNWGFRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG 360
CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPPF 420
HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSR L QFSQAGASDI RDQSRNWLPG 480
PCYRQQRVSK TSADNNSEF SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL 540
IFGKQGSEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV 600
LPGMVQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPV PANPSTT 660
FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY 720
SEPRPIGTRY LTRNL

```

В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2 и содержит аминокислотную вставку между аминокислотами 587 и 588, где пептидная вставка выбрана из группы пептидов, включающей:

- SASEAST (SEQ ID NO: 60);
- TPPSITA (SEQ ID NO: 61);
- PRTPHTA (SEQ ID NO: 62);
- NHAPNHC (SEQ ID NO: 63).

Пептидные вставки между N587 и R588 были описаны в предшествующем уровне техники (David A., 2018; заявка на EP № 19206603.3, неопубликованная). В этих вариантах осуществления капсидный полипептид AAV содержит пептидную вставку, состоящую из 7 аминокислот, также называемую для краткости 7-мерной пептидной вставкой.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления капсидный полипептид

AAV содержит пептидную вставку, которая является 7-13-мерной. В частности, эти варианты осуществления содержат 7-мер, такой как 7-мерная пептидная вставка, описанная выше, и дополнительно содержат один или два фланкирующих линкера из 0-6 аминокислот, при этом 6 является максимальным количеством для общего количества добавленных на N-конце и C-конце фланкирующих аминокислот.

Некоторые иллюстративные варианты осуществления содержат пептидные вставки, не содержащие линкерной последовательности, а другие варианты осуществления содержат линкер с одной стороны или с обеих сторон. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы аминокислот, включающей без ограничения аланин (A), аспарагин (N), лизин (L), аргинин (R), треонин (T) или глицин (G) или их смесь.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления один или два фланкирующих линкера содержат аминокислоты, выбранные из:

- i. аминокислот G и A или
- ii. аминокислот A, N, L, T, R, G, A, N, L и R, в частности A, L, N, R, или предпочтительно состоят из них.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления один или оба фланкирующих линкера содержат по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из N и R. В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления линкеры содержат 2 или 3 аминокислоты с каждой из сторон. В некоторых из этих и других вариантов осуществления линкер состоит из одной или нескольких аминокислот, выбранных из аминокислот A, L, N, R. В иллюстративных предпочтительных вариантах осуществления линкер и пептидная вставка представлены в конфигурации NLA-пептид-AR.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления капсид представляет собой капсидный белок AAV2 или его мутантный вариант, который содержит пептидную вставку между N587 и R588, выбранную из:

- AAASASEASTAA (SEQ ID NO: 64),
- AAATPPSITAAA (SEQ ID NO: 65),
- AAAPRTPHTAAA (SEQ ID NO: 66),
- NLANHAPNH CAR (SEQ ID NO: 67),
- NLAPRTPHTAAR (SEQ ID NO: 68).

В данном тексте варианты осуществления капсида AAV2, содержащие вставку, также упоминаются в форме сокращенной номенклатуры, в которой указан серотип AAV дикого типа, за которым следует модификация в скобках. Такая сокращенная номенклатура для иллюстративных капсидов, содержащих пептидную вставку, описанную выше, представляет собой, например, AAV2(NHAPNH C), что означает капсид AAV2, содержащий 7 аминокислот в пептидной вставке, указанной в скобках, и необязательно дополнительно содержащий один или два фланкирующих линкера, или, например, капсид AAV2(P RTPHTA), содержащий пептидную вставку с 7 перечисленными

аминокислотами P RTPHTA и необязательно содержащий один или два фланкирующих линкера.

Вышеупомянутые иллюстративные варианты осуществления пептидных вставок, содержащих фланкирующие линкеры, перечислены ниже с фланкирующими линкерами в несколько расширенном окружении последовательности капсида AAV2. Иллюстративные варианты осуществления линкеров выделены подчеркиванием. Первые три линкера содержат аланин и представлены в форме -AAA-...-AA-, а последние два линкера содержат альтернативные аминокислоты, т. е. аргинин (R), аспарагин (N) и лизин (L), в дополнение к аланину (A) и представлены в форме -NLA-...-AR-, как показано ниже:

SEQ ID NO: 69:

580 - VSTNLQRGN-AAA- SASEAST-AA-RQAATADVNTQGVLPG;

SEQ ID NO: 70:

580 - VSTNLQRGN-AAA- TPPSITA-AA-RQAATADVNTQGVLPG;

SEQ ID NO: 71:

580 - VSTNLQRGN-AAA- P RTPHTA-AA-RQAATADVNTQGVLPG;

SEQ ID NO: 72:

580 - VSTNLQRGN-NLA-NHAPNHC-AR- RQAATADVNTQGVLPG;

SEQ ID NO: 73:

580 - VSTNLQRGN-NLA-P RTPHTA-AR- RQAATADVNTQGVLPG.

Капсиды, содержащие пептидную вставку NLANHAPNHCAR согласно SEQ ID NO: 67 или NLAP RTPHTAAR согласно SEQ ID NO: 68, являются новыми сами по себе и составляют независимое изобретение. Таким образом, эти новые капсиды не ограничиваются контекстом векторов на основе гAAV2 для упаковки трансгена, кодирующего химерные белки на основе опсина и GPCR, описанные в данном документе. В частности, эти новые капсиды не ограничены медицинским применением с химерным белком на основе опсина и GPCR или кодирующей его молекулой нуклеиновой кислоты согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения.

Таким образом, в **независимом изобретении** предусмотрен капсидный полипептид аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит пептидную вставку в положении между 587 и 592, предпочтительно между N587 и R588 в капсиде AAV серотипа 2 или в положении, гомологичном ему в AAV другого серотипа, где пептидная вставка выбрана из группы последовательностей, включающей:

- NLANHAPNHCAR (SEQ ID NO: 67),

- NLAP RTPHTAAR (SEQ ID NO: 68).

В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой капсид AAV2 и содержит по меньшей мере одну мутацию, где эта по меньшей мере одна мутация выбрана из:

a. замены тирозина (Y) на фенилаланин (F) в аминокислотном положении 252, 272, 444, 500, 700, 704 и/или 730; и/или

b. замены треонина (T) на валин (V) в аминокислотном положении 491.

Особенно предпочтительный вариант осуществления нового капсида содержит аминокислотные последовательности капсидного белка AAV2 со вставкой NLAPRTPHTAAR согласно SEQ ID NO: 74, как показано ниже.

VP3 (последовательность, показанная серым цветом) перекрывается с VP1, мутации по типу замены тирозина на фенилаланин (Y-F) выделены темно-серым цветом и подчеркиванием, нумерация аминокислот относится ко всей последовательности VP1. Наиболее высокий пик в G453 и второй по высоте пик в N587, где был вставлен мотив, выделены подчеркиванием и указаны белой заливкой. Вставка выделена курсивом и заключена в рамку.

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSR
 GLVLPGYKYLGPFNGLDKGE PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSG
 DNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPL
 GLVEE PVKTAPGKKRPVEHSPVE PDSSSGTGKAGQQPARKRLN
 FGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNN
 EGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSRTWALPTFNNHLYK
 QISSQSGASNDNHFFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLIN
 NNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFT
 DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAV
 GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSL
 DRLMNPLIDQYLYFLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQ
 SRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEFSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI FGKQGSEKTNVDIEKVMIT
 TDEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQ^{RGN}NLAPRTPHTAARQAA
 TADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPML
 GGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQ
 VSVEIEWELQKENS^{KRW}NPEIQ^FTSN^{YNK}SVNVDFTVD^{TNG}VY
 SEPRPIGTR^{FL}TRNL

Третий аспект и независимое изобретение также относятся к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим капсиды AAV, описанные выше.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный полипептид, выбранный из AAV2, AAV2(7m8), или AAV8(BP2), или AAV2(NHAPNHC), или AAV2(PRTPHTA), или состоит из нее.

В некоторых вариантах осуществления представлена молекула нуклеиновой кислоты согласно пункту 49 формулы изобретения, где молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность с пептидной вставкой

между N587 и R588 в геноме AAV2, выбранной из:

- AAASASEASTAA (SEQ ID NO: 64),
- AAATPPSITAAA (SEQ ID NO: 65),
- AAAPRTPHTAAA (SEQ ID NO: 66),
- NLANHAPNH CAR (SEQ ID NO: 67),
- NLAPRTPHTAAR (SEQ ID NO: 68), или состоит из нее.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит трансген, в частности, кодирующий химерный белок на основе опсина и GPCR. В некоторых предпочтительных из этих вариантов осуществления трансген содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43, или состоит из нее.

В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий химерный GPCR *mela(palm)-mGluR6*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или состоящий из нее.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей капсид и трансген, трансген функционально связан с клеточноспецифическим промотором. В некоторых из этих вариантов осуществления клеточноспецифический промотор представляет собой, в частности, промотор, специфичный для ON-биполярных клеток, более конкретно промотор, выбранный из группы, включающей промотор 200En-mGluR500P, промотор 770En_454P(hGRM6) согласно SEQ ID NO: 75, или промотор 444En_454P(hGRM6) согласно SEQ ID NO: 76, или эндогенный промотор *mGluR6* ON-биполярных клеток сетчатки, или их элементы.

Термины "*Mela(palm)-mGluR6*" или "*Mela(palm+33)-mGluR6*" относятся к предпочтительным вариантам осуществления химерных белков на основе опсина меланопсина и GPCR *mGluR6*, содержащих усеченный СТ меланопсина, усеченный по сайту пальмитоилирования или усеченный на 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования соответственно.

Соответственно, в некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей капсид, капсид выбран из капсида AAV2(7m8), или AAV8(BP2), или AAV2(NHAPNHС), или AAV2(PRTPHTA). Кроме того, указанные молекулы нуклеиновых кислот дополнительно содержат трансген, кодирующий предпочтительный вариант осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR, такой как *Mela(palm)-mGluR6* или *Mela(palm+33)-mGluR6*, и, кроме того, трансген находится под контролем промотора 770En-445P(hGRM6) или промотора

444En_454P(hGRM6).

В некоторых вариантах осуществления независимого изобретения, относящегося к новому капсиду rAAV, предусмотрен вектор, содержащий новый капсид rAAV с новой пептидной вставкой, описанной выше.

Во всех случаях, когда вариант осуществления капсида согласно пятому аспекту настоящего изобретения относится к конкретной последовательности согласно конкретному SEQ ID NO, подразумевается, что в эти варианты осуществления включены варианты конкретной последовательности, описанной выше.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид согласно первому аспекту настоящего изобретения. Таким образом, четвертый аспект относится к вектору для переноса гена в клетку-мишень и, в частности, также для экспрессии в ней химерного белка на основе опсина и GPCR. Другими словами, вектор согласно четвертому аспекту настоящего изобретения содержит трансген, кодирующий химерные белки на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Соответственно, предусмотрен вектор, в частности вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, которая описана в первом и втором аспектах настоящего изобретения соответственно. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты содержит промотор, функционально связанный с трансгеном, кодируемым молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR.

В некоторых вариантах осуществления перед трансгеном расположена оптимизированная последовательность Козак. Последовательность Козак характеризуется консенсусной последовательностью (gcc)gccAccAUGG (SEQ ID NO: 77) или (gcc)gccGccAUGG (SEQ ID NO: 78) и усиливает инициацию трансляции.

В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит регуляторную последовательность WPRE (посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков) (см. SEQ ID NO: 20 в Hulliger et al. 2010). WPRE представляет собой последовательность ДНК, которая при транскрипции создает третичную структуру, усиливающую экспрессию.

В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит поли(А)-хвост, встроенный ниже трансгена. Поли(А)-хвост способствует трансляции трансгена.

В некоторых вариантах осуществления вектор получен из аденоассоциированного вируса (AAV). Указанный вектор представляет собой рекомбинантный (rAAV) вектор, так как он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR или химерный С-концевой пептид согласно первому аспекту настоящего

изобретения, описанному выше.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой односторонний вектор (ssAAV) либо самокомплементарный вектор (scAAV).

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV, в частности, выбранный из группы серотипов AAV, включающей AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе гAAV2 или гAAV8.

В некоторых из этих и других вариантов осуществления вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы последовательностей, включающей:

- последовательность, кодирующую капсидный белок AAV, и/или
- промотор, в частности клеточноспецифический промотор, более конкретно промотор, специфичный для биполярных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, содержащих промотор, в частности клеточноспецифический промотор, вектор дополнительно содержит энхансерную последовательность и необязательно спейсер. От 5'-конца к 3'-концу вектор содержит вначале энхансер, затем необязательный спейсер и затем промотор. Трансген расположен в 3'-направлении от промотора для экспрессии трансгена под управлением промотора, т. е. трансген функционально связан с промотором.

В некоторых вариантах осуществления, в частности вектора, экспрессирующего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий СТ целевого GPCR mGluR6, вектор содержит промотор, специфичный для ON-биполярных клеток. В некоторых из этих вариантов осуществления промотор, специфичный для ON-биполярных клеток, выбран из группы, включающей промотор GRM6-sv40 (Kim et al., 2008), или промотор 4xGRM6-sv40 (Cronin et al., 2014), или промотор 200En-mGluR500P (Lu et al., 2016), или промотор 770En_454P(hGRM6) или 444En_454P(hGRM6) (см. Hulliger et al., 2020 и EP19200082.6 (неопубликованная)).

Промотор 770En_454P(hGRM6) содержит SEQ ID NO: 75 или состоит из нее. Промотор 770En_454P(hGRM6) содержит энхансер 770En(hGRM6) (от -14236 до -13467 относительно TLSS GRM6), содержащий последовательность размером 300 п. о., консервативную среди мышиного и человеческого геномов (от -13873 до -13467 относительно TLSS GRM6), и, кроме того, содержащий 3'-концевые пики в ChIP-seq и кластер гиперчувствительности к ДНКазам (от -13990 до -13816 относительно TLSS GRM6).

Промотор 444En_454P(hGRM6) содержит SEQ ID NO: 76 или состоит из нее. Промотор 444En_454P(hGRM6) содержит энхансер 444En(hGRM6) (от -14033 до -13590 относительно TLSS GRM6) и представляет собой 3'- и 5'-усеченную версию 770En(hGRM6), содержащую только 3'- и 5'-концевые пики в ChIP-seq.

В некоторых вариантах осуществления вектора, содержащего

клеточноспецифический промотор, клеточноспецифический промотор представляет собой эндогенный промотор mGluR6 ON-биполярных клеток сетчатки или его элементы.

Некоторые предпочтительные варианты осуществления вектора, содержащего промотор, специфичный для ON-биполярных клеток, описанный выше, экспрессируют молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе меланопсина и mGluR6. В некоторых из этих вариантов осуществления химерный белок на основе меланопсина и mGluR6 содержит СТ опсина, усеченный по сайту пальмитоилирования, также называемый для краткости Mela(palm)-mGluR6, или усеченный на 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования, также называемый для краткости Mela(palm+33)-mGluR6. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления вектор содержит химерный OPN1mw-mGluR6 или химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий два опсина.

Некоторые особенно предпочтительные варианты осуществления вектора экспрессируют Mela(palm)-mGluR6 согласно одному из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или Mela(palm+33)-mGluR6, в частности согласно SEQ ID NO: 15, или Mela-mGluR6, дополнительно содержащий внутриклеточную петлю, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31, под контролем промотора, специфичного для ON-биполярных клеток, выбранного, в частности, из промотора 200En-mGluR500P, 770En_454P(hGRM6) или 444En_454P(hGRM6) или эндогенного промотора mGluR6 ON-биполярных клеток сетчатки или их элементов.

Некоторые варианты осуществления вектора содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид AAV согласно третьему аспекту настоящего изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вектор кодирует капсид AAV с пептидной вставкой между N587 и R588, описанной выше.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вектор содержит промотор 770En-445P(hGRM6), функционально связанный с трансгеном, кодирующим химерный белок на основе опсина и GPCR, и дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, экспрессирующую AAV2(7m8), или AAV8(BP2), или AAV2(NHAPNHC), или AAV2(PRTPHTA). В некоторых из этих и других вариантов осуществления химерный белок на основе опсина и GPCR предпочтительно выбран из:

- химерного белка на основе опсина и GPCR, содержащего меланопсин или hOPN1mw в качестве вышерасположенного опсина и mGluR6 в качестве целевого опсина, или химерного белка на основе опсина и GPCR, содержащего два опсина,
- химерного белка на основе опсина и GPCR, выбранного из Mela(palm)-mGluR6 или Mela(palm+33)-mGluR6,
- химерного белка на основе опсина и GPCR в соответствии с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31.

Особенно предпочтительный вариант осуществления вектора содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 79 или состоит из нее. В этом варианте осуществления вектора он содержит иллюстративный трансген hMela(palm)-mGluR6 согласно SEQ ID NO: 19 под контролем промотора 770Ep-445P(hGRM6) и дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид AAV8(BP2).

Во всех случаях, когда вариант осуществления вектора согласно четвертому аспекту настоящего изобретения относится к конкретной последовательности согласно конкретному SEQ ID NO, подразумевается, что в эти варианты осуществления включены варианты конкретной последовательности, описанной выше.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к носителям, таким как частицы, в частности наночастицам, везикулам, линиям клеток, в частности за исключением линий зародышевых клеток, **и животным,** содержащим или экспрессирующим молекулы нуклеиновых кислот согласно второму аспекту или векторы согласно третьему аспекту или содержащим химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту.

В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта настоящего изобретения предусмотрено трансгенное животное, в частности трансгенная мышь или трансгенная линия клеток. Трансгенное животное или трансгенная линия клеток содержит молекулу нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения или вектор согласно четвертому аспекту и/или экспрессирует химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Некоторые варианты осуществления трансгенных клеток получены из линии клеток, подходящей для экспрессии химерного белка на основе опсина и GPCR, такой как линия стволовых клеток, которая необязательно исключает трансгенные линии зародышевых клеток, или органотипическая линия клеток. В частности, подходящая линия клеток выбрана из группы линий клеток, включающей:

- клетки HEK293-GIRK,
- нейроны внутренних слоев сетчатки, в частности ON-биполярные клетки,
- клетки почки и
- клетки, экспрессирующие G-белок, выбранный из Gs, Gq или G_{12/13}.

Некоторые варианты осуществления трансгенного животного или трансгенной клетки содержат геном, модифицированный посредством CRISPR/Cas. Специалисту в данной области известно редактирование генома посредством CRISPR/Cas (см., например, Vandemoortele et al. (2017), например, Long et al. (2018), например, Hsu et al (2014), *Cell* 157(6):1262-1278 и литературные источники, упоминаемые в них).

В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта в настоящем изобретении предусмотрен носитель, в частности частица, или наночастица, или везикула, для переноса химерного белка на основе опсина и GPCR или кодирующих его молекулы нуклеиновой кислоты или вектора согласно одному из предыдущих аспектов настоящего изобретения в клетку-мишень.

В некоторых вариантах осуществления носитель содержит молекулу нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту или вектор согласно четвертому аспекту, которые содержат трансген, кодирующий химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения, или же он содержит химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой наночастицу или микрочастицу, которая особенно подходит для применения с геной пушкой. В некоторых из этих и других вариантов осуществления носитель представляет собой частицу золота.

В данном тексте носитель для переноса химерного белка на основе опсина и GPCR или молекулы нуклеиновой кислоты или вектора также сокращенно называется "носителем для переноса". Носитель для переноса относится к любой подходящей химической или физической структуре, которая способна присоединять или упаковывать химерный белок на основе опсина и GPCR или молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, содержащие трансген, кодирующий химерный белок на основе опсина и GPCR, подходящей для их переноса в реципиентный геном клетки-мишени или организма-мишени человека или животного, отличного от человека.

Иллюстративные варианты осуществления носителя для переноса представляют собой везикулы и частицы, в частности микро- или наночастицы. Иллюстративные везикулы включают, например, мембранные везикулы биологического или синтетического происхождения. Иллюстративные частицы представляют собой, в частности, микро- и наночастицы, подходящие для применения с геной пушкой, и включают, например, частицы золота, покрытые химерным белком на основе опсина и GPCR или кодирующей его химерной нуклеиновой кислотой, в частности в виде адсорбированного или ковалентно присоединенного лиганда (O'Brian and Lummis, 2011). В некоторых вариантах осуществления носителя он содержит трансген и кассету CRISPR/Cas, т. е. плазмиду, кодирующую фермент Cas, такой как, например, Cas9, и одну или несколько направляющих РНК (gRNA), в частности одиночную(одиночные) направляющую(направляющие) РНК (sgRNA), или плазмиду, кодирующую фермент Cas, в частности Cas9, который должен применяться в комбинации с вводимыми путем отдельной трансфекции одной или несколькими gRNA, в частности sgRNA.

В некоторых из этих и других вариантов осуществления настоящего изобретения носитель содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения или вектор согласно четвертому аспекту настоящего изобретения, которые содержат трансген и кассету CRISPR/Cas.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления трансгенное животное, или трансгенная клетка, или носитель для переноса, описанные выше, содержат трансген, кодирующий химерный белок на основе меланопсина и mGluR6 (Mela-mGluR6), в частности Mela(palm)-mGluR6 или Mela(palm+33)-mGluR6, или химерный OPN1mw-mGluR6, или химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий два опсина.

В некоторых дополнительных предпочтительных вариантах осуществления в

трансгенном животном, или трансгенной клетке, или носителе для переноса, описанных выше, трансген кодирует химерный Mela-mGluR6, выбранный из группы, включающей:

- Mela(palm)-mGluR6, в частности в соответствии с одной из последовательностей, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или

- Mela(palm+33)-mGluR6, в частности согласно SEQ ID NO: 15, или

- Mela-mGluR6, дополнительно содержащий внутриклеточную петлю, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31.

Во всех случаях, когда вариант осуществления носителей, клеток или животных согласно пятому аспекту настоящего изобретения относится к конкретной последовательности согласно конкретному SEQ ID NO, подразумевается, что в эти варианты осуществления включены варианты конкретной последовательности, описанной выше.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к способу получения посредством генной инженерии молекул нуклеиновых кислот согласно второму аспекту, кодирующих химерные белки на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Кроме того, шестой аспект настоящего изобретения относится к способу конструирования молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный С-концевой пептид, содержащий проксимальную область СТ вышерасположенного опсина, в частности согласно первому аспекту настоящего изобретения, и СТ целевого GPCR.

Консервативная 3D-структура, общая для всех белков GPCR, и, в частности, также повсеместно консервативные мотивы в GPCR, такие как E(D)RY вблизи участка соединения TM3/IL2, E вблизи участка соединения IL3 с TM6, NPxxY вблизи дистального конца TM7 и NR (K)Q вблизи проксимального конца спирали 8, или частично консервативные элементы, такие как сайты пальмитоилирования на дистальном конце H8, и дополнительные элементы, консервативные среди GPCR, легко идентифицируются при выравнивании последовательностей с выступающим в качестве прототипа GPCR бычьим родопсином.

Иллюстративные подходящие сайты сплайсинга также легко идентифицируются путем необязательного структурного выравнивания участков соединения трансмембранного домена и внутриклеточного домена GPCR и путем сканирования последовательностей, в частности около участков соединения между трансмембранным и внутриклеточным доменами, на наличие консервативных мотивов последовательностей.

Сохранение или воссоздание консервативных мотивов или их функциональных вариантов из одного или нескольких выбранных исходных GPCR (исходного опсина/исходного целевого GPCR) в химерных участках соединения между ними с высокой вероятностью приводит к получению функционально активного химерного GPCR.

Соответственно, в шестом аспекте настоящего изобретения предусмотрен

эффективный и простой способ получения посредством генной инженерии и разработки химерных GPCR с требуемыми функциональными возможностями, такими как светочувствительность опсинов, надлежащая внутриклеточная транспортировка, эффективное связывание G-белка и специфичность в отношении G-белка у целевых GPCR. Для такого способа необходим лишь один обязательный сайт слияния между вышерасположенным опсином и целевым СТ. Требуемый сайт усечения вышерасположенного опсина легко идентифицируется на основании а) информации о местоположении H8 или одного или нескольких сайтов пальмитоилирования или "предполагаемых" сайтов пальмитоилирования, определяемом по соответствию с одним из сайтов пальмитоилирования в бычьем родопсине, как описано выше, или путем отсчитывания 7-13, в частности 8-12, более конкретно 9-11 или примерно 10 аминокислот ниже сайта NR(K)Q, и б) информации о местоположении С-конца целевого GPCR.

Консервативная 3D-структура, несмотря на минимальную гомологию последовательностей среди GPCR разных классов, демонстрирует чрезвычайно высокую допустимость изменчивости аминокислотной последовательности в функциональных доменах белков GPCR. Кроме того, конструирование функциональных химерных белков на основе опсина и GPCR упрощается благодаря сплайсингу в консервативных структурных элементах или мотивах или вблизи них при сохранении консервативной последовательности или ее функциональных аналогов, полученных, например, путем консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга преднамеренно располагаются в соответствующих положениях в пределах консервативных мотивов исходного GPCR и воссоздаются в той же или функционально эквивалентной версии. Данное обоснование применимо, в частности, к сплайсингу в мотиве NR(K)Q или в сайте пальмитоилирования, расположенном соответственно вблизи проксимального и дистального концов проксимальной области О-СТ.

Некоторые варианты осуществления способа конструирования молекулы нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения перед выбором сайта усечения в СТ вышерасположенного опсина и/или сайта разрезания в СТ целевого GPCR предусматривают идентификацию консервативных мотивов в одном или обоих исходных GPCR и кодирующих их генах путем включения стадий:

- выравнивания аминокислотной последовательности вышерасположенного опсина (или его фрагмента) с аминокислотной последовательностью целевого GPCR (или его фрагмента) с помощью инструмента для выравнивания последовательностей,

- определения аминокислотных положений, составляющих консервативный мотив, выбранный, в частности, из группы консервативных мотивов, включающей E(D)RY, E вблизи участка соединения IL3 с TM6, NPxxY вблизи участка соединения TM7/СТ, NR(K)Q и пальмитоилированный С в СТ и, при условии, что целевой GPCR представляет собой опсин, К для связывания хромофора в TM7.

В некоторых из этих вариантов осуществления аминокислотную последовательность опсина необязательно выравнивают с аминокислотной

последовательностью бычьего родопсина для идентификации аминокислотных положений, составляющих консервативный мотив. Подходящие инструменты для выравнивания включают, например, Clustal Omega (EMBL-EBI) и другие инструменты для выравнивания, описанные выше.

В некоторых из этих и других вариантов осуществления способ конструирования молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид, включает перед выбором сайта усечения в СТ вышерасположенного опсина и/или сайта разрезания в СТ целевого GPCR идентификацию консервативных 3D-доменов или субдоменов GPCR, в частности субдомена, представляющего собой спираль 8, в одном или обоих из исходного опсина и исходного целевого GPCR, включающую стадию ввода данных о первичной аминокислотной последовательности в программу для предсказания вторичной/третичной структуры белка. В данной области техники доступны подходящие программы, такие как, например, YASPIN (Lin et al., 2005) или другая программа, выбранная, например, из следующего перечня: https://molbiol-tools.ca/Protein_tertiary_structure.htm или Kuhlmann et al., 2019, или пакет программного обеспечения Schrodinger (<https://www.schrodinger.com/prime>). Доступные из уровня техники способы, которые описаны выше, в частности, включающие технологию рекомбинантных нуклеиновых кислот, разработку методом рекомбинантного клонирования *in silico* и химический синтез нуклеиновых кислот, известны специалисту в данной области.

Соответственно, в шестом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения посредством генной инженерии молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид, в частности описанные выше, которые содержат химерный С-концевой домен (химерный СТ), содержащий усеченный СТ опсина, который содержит проксимальную область О-СТ, и дополнительно содержащий фактически полный СТ целевого GPCR или его функциональное производное. Химерный СТ получен из СТ исходного вышерасположенного опсина и из СТ исходного целевого GPCR. Способ получения посредством генной инженерии включает стадии:

А-1 выбора сайта усечения (x) в СТ исходного вышерасположенного опсина в аминокислотном положении на дистальном конце проксимальной области О-СТ или в пределах дистального удлинения проксимальной области О-СТ,

А-2 получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей часть из вышерасположенного опсина или пептид с усеченным СТ, который усечен по выбранному сайту усечения;

В-1 выбора сайта разрезания (y) в пределах проксимальной области СТ целевого GPCR, в частности в мотиве NR(K)Q или выше него или между мотивами NPxxY и NR(K)Q,

В-2 получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей СТ целевого GPCR или его функциональный вариант, в частности функциональный фрагмент; и

С-1 слияния молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный СТ опсина, полученной на стадии А-2, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой СТ или его функциональный вариант, полученной на стадии В-2.

В некоторых вариантах осуществления способа получения посредством генной инженерии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид, на стадии А-1 сайт усечения (х) удовлетворяет одному из следующих критериев:

- сайт усечения (х) расположен в нуклеотиде, расположенном в мотиве NR(K)Q или на по меньшей мере 7, или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13 аминокислот ниже него,

- сайт усечения (х) расположен ниже сайта пальмитоилирования или аминокислоты, соответствующей сайту пальмитоилирования, и в частности является смежным с ним с дистальной стороны,

- сайт усечения расположен на расстоянии до не более 45, или 47, или 49 нуклеотидов ниже мотива NR(K)Q.

В некоторых вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR, в частности в вариантах осуществления с вышерасположенным опсином, содержащим удлиненный С-конец с необычно большим количеством аминокислот, таким как меланопсин, сайт усечения (х) расположен в аминокислотном положении ниже дистального конца проксимальной области О-СТ, в частности на дистальном конце дистального удлинения проксимальной области О-СТ в соответствии с приведенным выше описанием. Дистальный конец дистального удлинения проксимальной области О-СТ расположен, в частности, на расстоянии до 30, или 31, или 32, или 33, или 34, или 35 аминокислот ниже дистального конца проксимальной области О-СТ или до не более 45, или 47, или 49 нуклеотидов ниже мотива NR(K)Q соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, содержащих вышерасположенный опсин с удлиненным СТ, такой как меланопсин, сайт усечения (х) расположен ниже кластера консервативных сайтов фосфорилирования, которые способствуют прекращению ответа в виде фотоактивации. Такие консервативные сайты фосфорилирования, в частности, расположены между аминокислотными положениями, соответствующими положениям 381 и 397 мышинового меланопсина, как описано у Mure et al. 2016. Иными словами, в этих вариантах осуществления дистальный конец дистального удлинения проксимальной области О-СТ предпочтительно выбран расположенным ниже указанного кластера консервативных сайтов фосфорилирования или, в частности, смежным с дистальной стороны с его дистальным концом.

В некоторых вариантах осуществления способа получения посредством генной инженерии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид, как сайт усечения х в вышерасположенном опсине, выбранный на стадии А-1, так и сайт разрезания у в целевом GPCR, выбранный на стадии В-1, расположены в их соответствующих сайтах пальмитоилирования или в

аминокислотном положении, соответствующем сайту пальмитоилирования, либо оба они расположены на 7-13, в частности 8-12, более конкретно 9-11 или 10 аминокислот ниже сайта NR(K)Q.

Некоторые варианты осуществления способа получения посредством генной инженерии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид, включают одну или несколько дополнительных стадий замены или частичной замены одной или нескольких внутриклеточных петель, например, для замещения в соответствующих положениях одной или нескольких внутриклеточных петель или части внутриклеточной петли вышерасположенного опсина внутриклеточной петлей или частью внутриклеточной петли целевого GPCR,

где, в частности, один или несколько сайтов сплайсинга выбраны из группы сайтов сплайсинга, расположенных в:

- участке соединения a и участке соединения b для замены П1,
- участке соединения c и участке соединения d для замены П2,
- участке соединения e и участке соединения f для замены П3,
- двух сайтах сплайсинга в П3, в которых происходит удаление высоковариабельной области П3 вышерасположенного опсина с заменой на П3 целевого GPCR.

Седьмой аспект настоящего изобретения относится к путям медицинского применения с использованием вышеописанных продуктов, связанных с химерным белком на основе опсина и GPCR. Пути медицинского применения включают, в частности, лекарственные препараты и способы для лечения нуждающегося в этом человека или индивидуума, отличного от человека. Продукты согласно всем ранее описанным аспектам и вариантам осуществления настоящего изобретения применимы к седьмому аспекту, т. е. для путей медицинского применения.

Продукты согласно описанным выше аспектам настоящего изобретения, применимые для медицинского применения, в частности, для применения в генной терапии, выбраны из группы продуктов, включающей:

- химерный **белок на основе опсина и GPCR** согласно первому аспекту настоящего изобретения,
- **молекулу нуклеиновой кислоты**, кодирующую указанный белок на основе опсина и GPCR, согласно второму аспекту настоящего изобретения,
- **капсид или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный капсид**, согласно третьему аспекту настоящего изобретения,
- **вектор** согласно четвертому аспекту настоящего изобретения,
- **носитель или клетку** согласно шестому аспекту настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления седьмой аспект настоящего изобретения относится к медицинскому лечению, в частности в форме генной терапии, пациентов, страдающих частичной или полной потерей зрения. В некоторых из этих вариантов осуществления продукты содержат или кодируют химерный белок на основе опсина и

GPCR, содержащий опсин и mGluR6 или содержащий два опсина.

В данном тексте варианты осуществления, содержащие два опсина, т. е. содержащие вышерасположенный опсин и целевой опсин, для краткости также называются химерными белками опсин-опсин (GPCR). Варианты осуществления, содержащие вышерасположенный опсин и mGluR6, для краткости также называются молекулами опсин-mGluR6.

Некоторые предпочтительные варианты осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6 для медицинского лечения содержат меланопсин или любой другой опсин, такой как, например, опсин кубомедузы, парапинопсин или родопсин паука-скакуна или их гуманизированный вариант или опсин колбочек, в качестве вышерасположенного, слитый с mGluR6 в качестве целевого GPCR. Некоторые другие предпочтительные варианты осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR для медицинского лечения содержат два опсина и содержат, в частности, любой опсин, слитый с целевым GPCR, полученным из опсина колбочек или родопсина.

В некоторых из этих предпочтительных вариантов осуществления и в дополнительных вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6 для медицинского лечения вышерасположенный опсин усечен на дистальном конце проксимальной области О-СТ, в частности по сайту пальмитоилирования, как описано выше, как, например, в иллюстративном Mela(palm)-mGluR6, описанном в данном документе; в других из этих предпочтительных и дополнительных вариантов осуществления вышерасположенный опсин усечен на дистальном конце дистального удлинения проксимальной области О-СТ, в частности на примерно 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования, как описано выше, как, например, в иллюстративном Mela(palm+33AA)-mGluR6, описанном в данном документе.

В некоторых из предпочтительных вариантов осуществления медицинского применения согласно seventhому аспекту настоящего изобретения, в частности генной терапии, для улучшения зрения, для лечения частичной или полной потери зрения согласно seventhому аспекту настоящего изобретения трансген функционально связан с промотором, специфичным для ON-биполярных клеток, в частности с промотором 770En_454P(hGRM6) или 444En_454P(hGRM6).

В некоторых из предпочтительных вариантов осуществления медицинского применения согласно seventhому аспекту настоящего изобретения для лечения частичной или полной потери зрения применяют вектор для генной терапии, в частности вектор на основе гAAV. В некоторых из этих и других вариантов осуществления применяют капсид AAV, в частности AAV2(7m8), AAV2(BP2) или AAV2 с пептидной вставкой, описанной выше.

В некоторых вариантах осуществления seventhого аспекта настоящего изобретения химерный белок на основе опсина и GPCR предназначен для применения в медицинском лечении пациентов, страдающих частичной или полной потерей зрения, при этом медицинские показания для лечения, в частности, выбраны из группы, включающей

пигментный ретинит (RP), возрастную дегенерацию желтого пятна и любую другую форму дегенерации фоторецепторов.

Седьмой аспект настоящего изобретения дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей продукт согласно настоящему изобретению. В частности, фармацевтическая композиция представлена в форме подходящего фармацевтического состава для введения в глаз.

В иллюстративном варианте осуществления вектор на основе AAV, описанный выше, растворяют в забуференном солевом растворе для субретинальной либо интравитреальной инъекции в глаз. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления AAV растворяют в забуференном солевом растворе (PBS) с 0,04% Tween-20 в качестве генотерапевтического состава.

Кроме того, седьмой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения нуждающегося в этом индивидуума-человека или индивидуума, отличного от человека, в частности животного, включающему введение продукта, выбранного из группы продуктов согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способа химерный белок на основе опсина и GPCR вводят путем интравитреального введения, в частности путем интравитреальной инъекции, или путем субретинального введения.

В данном тексте термин "интравитреальное введение" относится к пути введения фармацевтического средства, такого как, например, молекула нуклеиновой кислоты, вектор или носитель для переноса, посредством которого средство доставляется в стекловидное тело глаза. Интравитреальное введение представляет собой процедуру внесения лекарственного препарата непосредственно в пространство в задней части глаза, называемое полостью стекловидного тела, которое заполнено студенистой жидкостью, называемой гелеобразным веществом стекловидного тела.

В данном тексте термин "субретинальное введение" относится к пути введения фармацевтического средства, в частности вируса в контексте данного описания, в пространство между клетками пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторами.

Седьмой аспект настоящего изобретения дополнительно относится к применению продуктов согласно настоящему изобретению при изготовлении лекарственного препарата для медицинской терапии для улучшения зрения, или для лечения частичной или полной слепоты, или для лечения пигментного ретинита (RP), или для лечения дегенерации желтого пятна, или для лечения других форм дегенерации фоторецепторов.

Седьмой аспект настоящего изобретения также относится к описанному выше **медицинскому применению**, предусматривающему продукт, выбранный из группы продуктов, включающей:

- химерный белок на основе опсина и GPCR согласно первому аспекту настоящего изобретения,
- молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный белок на основе опсина и GPCR, согласно второму аспекту настоящего изобретения,
- капсид или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный капсид,

согласно третьему аспекту настоящего изобретения,

- вектор согласно четвертому аспекту настоящего изобретения,
- носитель или клетку согласно шестому аспекту настоящего изобретения,

где продукт содержит химерный белок на основе опсина и GPCR или содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный химерный белок на основе опсина и GPCR,

где химерный белок на основе опсина и GPCR выбран из группы, включающей:

- Mela(palm)-mGluR6, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28, или

- Mela(palm+33)-mGluR6, в частности согласно SEQ ID NO: 16, или

- Mela-mGluR6, дополнительно содержащий внутриклеточную петлю, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32.

Во всех случаях, когда вариант осуществления медицинского применения согласно седьмому аспекту настоящего изобретения относится к конкретной последовательности согласно конкретному SEQ ID NO, подразумевается, что в эти варианты осуществления включены варианты конкретной последовательности, описанной выше.

Ниже без ограничения представлены дополнительные иллюстративные подробности, относящиеся к некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, например, в примерах, таблицах, перечнях последовательностей, зависимых пунктах формулы изобретения, условных обозначениях к фигурам и фигурах. Эти иллюстративные варианты осуществления являются демонстрационными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Во всех случаях, где альтернативы для отдельных отделимых признаков описаны как "варианты осуществления", следует понимать, что такие альтернативы могут свободно использоваться в комбинации и по-прежнему оставаться в рамках объема настоящего изобретения, описанного в данном документе.

Что касается некоторых иллюстративных вариантов осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR с меланопсином в качестве вышерасположенного опсина с усеченным СТ, то иллюстративный сайт усечения идентифицирован в показанных ниже аминокислотных последовательностях человеческого и мышинового меланопсина. Данный сайт усечения расположен на 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования (пальмитоилированного цистеина). Данный иллюстративный сайт усечения называется сайтом "palm+33AA", и он образует дистальный конец дистального удлинения проксимальной области О-СТ.

В показанных ниже отрезках последовательностей генов человеческого или мышинового меланопсина (OPN4) аминокислотные последовательности С-концевого фрагмента меланопсина начинаются с проксимального конца проксимальной области О-СТ, т. е. с мотива NR(K)Q (который в hOPN4 и mOPN4 представляет собой НРК). Сайт усечения palm+33AA указан стрелкой вниз в аминокислотном положении 397. В рамке

показаны следующие аминокислотные остатки:

- консервативный НРК, т. е. мотив NR(K)Q,
- пальмитоилированный цистеин,
- консервативные фосфорилированные сериновые и треониновые остатки выше

сайта усечения.

hOPN4 - SEQ ID NO: 57

```
... [НРК]YRVAIAQHLP [C]LGVLLGVSRHRSPYP [S]YR [ST]HR [ST]L [TS]H [TS]NL (397Δ) SWISIRRRQESLGSESEVGVWTHMEAAAV
WGAAQQANGRSLYGQGLEDLKAKAPPRPQGHEAETPGKTKGLIPSDPRM
```

mOPN4 - SEQ ID NO: 58

```
... [НРК]YRVAIAQHLP [C]LGVLLGVSGQRSHPSL [S]YR [ST]HR [ST]L [SS]Q [SS]DL (397Δ) SWISGRKRQESLGSESEVGVWTDTTETAA
WGAAQQASGQSFCSQNLEDGELKASSSPQTKGHLPSLDLGM
```

В других иллюстративных вариантах осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR, в частности химерного белка на основе меланопсина и GPCR, сайт усечения в усеченном СТ может быть расположен в любом аминокислотном положении выше сайта "palm+33AA" или, дополнительно, ниже, например, на расстоянии до, например, 34 или 35 аминокислот ниже сайта пальмитоилирования.

Иллюстративные соответствующие консервативные сайты исходных опсинов и исходных целевых GPCR, которые преимущественно являются консервативными или воссоздаются в виде функциональных производных в химерных белках на основе опсина и GPCR, представлены ниже в следующей таблице I.

Иллюстративные тестируемые сайты сплайсинга, которые позволяют получить функциональные химерные белки на основе опсина и GPCR, представлены ниже в следующей таблице II.

В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга расположены в консервативных мотивах или сайтах обоих исходных GPCR.

В некоторых вариантах осуществления консервативные мотивы или сайты служат ориентиром для идентификации подходящих сайтов сплайсинга. Такие сайты сплайсинга будут располагаться на эквивалентном расстоянии от конкретного консервативного мотива или сайта в обоих исходных GPCR, такого как иллюстративный сайт palm+33, описанный выше.

Как правило, последовательности исходных опсинов выравнивают по консервативным сайтам для идентификации подходящих сайтов сплайсинга для соединения доменов или субдоменов двух исходных GPCR (например, путем разрезания и последующего лигирования или путем синтеза нуклеиновой кислоты для разработанного *in silico* химерного белка на основе опсина и GPCR).

В некоторых вариантах осуществления, в которых в исходном опсине отсутствуют известные сайты пальмитоилирования, для идентификации сайтов, подходящих для

сплайсинга или в качестве ориентира, выравняли как сайты, способные к пальмитоилированию, так и сайты, соответствующие сайтам пальмитоилирования в бычьем родопсине.

Таблица 1		Консервативный мотив						
Функция		Ионный замок		Структура	Хромофорный карман		Стабилизация посредством	
Местоположение		Участок соединения TM3 с IL2	Участок соединения IL3 с TM6	Участок соединения TM7 с TT	Lys в TM7 связан с ретиналем	Отрицательный противоион	Проксимальный конец H8	Сайт пальмитоилирования (Cys)
Иллюстративный GPCR								
Опсин		E(D)RY	E	NPxxY	K	E	NR(K)Q	C
Название	Ген							
Бычий родопсин/	RHO	E134-Y136	E247	N302-Y306	K296	E113	N310-Q312	C322 C323
Человеческий меланопсин	OPN4	D167-Y169	E291	N346-Y350	K340	E215	H354-K356	C367
Мышиный меланопсин	OPN4	D166-Y168	E288	N343-Y347	K337	E214	H351-K353	C364
hOPN1SW	hOPN1SW	E131-Y133	E244	N299-Y303	K293	E110	N307-Y309	C319
hOPN1MW	hOPN1MW	E150-W152	E263	N318-Y322	K312	E129	N326-Q328	G338*, K339*
hOPN1LW	hOPN1LW	E150-W152	E263	N318-Y322	K312	E129	N326-Q328	G338*, K339*
Опсин кубомедузы	JellyOP/ CubOP	D103-Y105	E224	N281-Y285	K275	E63*/A82	H289-Q291	C301
Человеческий энцефалопсин	hOPN3	E138-Y140	E250	N305-Y309	K299	D117	I313-K315	C325

Нейропсин ?	hOPN5	D130-Y132	E247	N302-Y306	K296	E177	D310-K312	A323\$
Парапинопсин	PPO	D120-F122	E231	N286-Y290	K280	E167	N295-Q297	C307
Родопсин паука-скакуна	JSR1	D147-Y149	E272	N327-Y331	K321	E194	H335-K337	C348
Целевой GPCR		E(D)RY	E	NPxxY	NA	NA	NR(K)Q	C
Название	Ген							
Человеческий и мышинный метаботропный глутаматный рецептор 6	hmGluR6	N673-I675	E781	V837-Y841	-	-	H846-E848	-
	GRM6							
	mmGluR6		E775	V831-Y835	-	-	H840-E842	-
Мышинный серотониновый рецептор 7	5-HT7 HTR7	N391-D393	E325	N383-Y387	-	-		C404

Примечания:

NA=неприменимо для отличных от опсиновых GPCR согласно настоящему изобретению

\$ непальмитоилированная аминокислота, соответствующая C322/C323 бычьего родопсина

Таблица 2

SEQ ID NO	Сайты сплайсинга	Аминокислотная последовательность в сайте сплайсинга Последовательность опсина: латинские буквы Последовательность целевого GPCR: курсивные буквы Консервативные мотивы и сайты пальмитоилирования: показаны в рамке Спираль 8 выделена подчеркиванием, NA - неприменимо	Исходный опсин: сокращенное название белка/ название гена	Проксимал ьный домен или область	Дистальный домен/ область, если применимо	<i>Исходный целевой GPCR</i>	<i>Создаваемый домен</i>
45	palm	<u>NPIIYAITHPKYRVAIAQHLPCLFHP</u><u>EQNVOKRK</u> <u>RS</u><u>SLKKTSTMAAPPKSENSEDAK</u>	Mela hOPN4	Усеченный СТ	NA	<i>mGluR6</i>	<i>CT</i>
46	palm+33	<u>HPKYRVAIAQHLPCLGVLLGVSGQRSHPSLSYRS</u> <u>THRSTLSSQSSDL(397) HPEQNVOKRKR</u><u>SLKKTST</u> <u>MAAPPKSENSEDAK</u> (397 указывает на аминокислотное положение, дистальное относительно консервативных сайтов фосфорилирования)	Mela hOPN4	Усеченный СТ	NA	<i>mGluR6</i>	<i>CT</i>
47	Участок соединения a Участок соединения b	<u>GMLGNLTVIYTF_MRHNDTPIVRASGREL_FIINLAVS</u> <u>DFLM</u>	Mela hOPN4	TM1	TM2	<i>mGluR6</i>	<i>IL1</i>
48	Вариабельна	<u>IFIFRA</u> ↓ <u>IRETG_RGVPETFNEA_PLRQRRQWQRLQSE</u>	Mela	Проксимал	Дистальная	<i>mGluR6</i>	<i>IL3</i>

	я область	WKMAK↓VALIVIL (стрелками указаны сайты сплайсинга на границе раздела мембрана/цитозоль, используемые в изначальных химерных белках на основе опсина и mGluR6)	hOPN4	ьная область IL3	область IL3		
49	palm	F[NPIIY]CFL[HKQ]FRAVLRGVC[Q] QYRNINRKL SAAGM HEALKLAERPERSEFVLQNC DHCGKKGHDT	Опсин медузы CubOP	Усеченный CT	NA	5HT7	CT
50	palm	F[NPIIY]CFL[HKQ]FRAVLRGVC[Q] LF[HPE]QNVQKRKR [S]LKKTSTMAAPPKSENSEDAK	JellyOP CubOP	Усеченный CT	NA	mGluR6	CT
51	palm	Y[NPIIY]VFM[NRQ]FRNCILHL[F] [HPE]QNVQKRKR[S]LK KTSTMAAPPKSENSEDAK	Опсин колбочек hOPN1MW	Усеченный CT	NA	mGluR6	CT
52	palm	[NPIIY]AIT[HPK]YRVAIAQHLPC[Q] GKKVDDSSSELSSTSKT EVSSVSSVSPA	Mela hOPN4	Усеченный CT	NA	Опсин колбочек OPN1MW	CT
54	Участок соединения а Участок соединения b	TGMLGNLTVIY_ATMKFKLRH_PANMFIINLAVSDF L	Mela hOPN4	TM1	TM2	Опсин колбочек OPN1MW	IL1
55	Участок соединения с Участок	TAIAL[DRY]LVI_CKPFGNVRFDAKL_TALVLLGVWLY ALAWSLPPF	Mela hOPN4	TM3	TM4	Опсин колбочек OPN1MW	IL2

	соединения d						
56	Участок соединения e Участок соединения f	LIIIFCYI_QVWLAIRAVAKQQKESESTQKAEKEVT_KVA LIVILLFVL	Mela hOPN4	TM5	TM6	Опсин колбочек <i>OPN1MW</i>	<i>IL3</i>

Примечания относительно сокращений сайтов сплайсинга:

Palm=сайт пальмитоилирования или аминокислотное положение, соответствующее сайту пальмитоилирования

Palm+33=аминокислотное положение на 33 аминокислоты ниже Palm

Участок соединения=участок соединения в области перехода между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом

Вариабельная область=два сайта сплайсинга, в которых вырезается высоковариабельная область IL опсина, которая замещается IL целевого GPCR

Иллюстративный сайт сплайсинга х-3 для вариантов осуществления с двумя опсинами

Примеры

На фигурах 5-12, помимо визуализации под микроскопом, показаны результаты трех различных экспериментальных подходов, применяемых для подтверждения функции химерных белков на основе опсина и GPCR.

In vitro

1. Анализ активности $G\beta\gamma$ методом локальной фиксации потенциала в HEK-GIRK. Функциональные опсины экспрессировали в линии клеток HEK293, стабильно экспрессирующей калиевые GIRK-каналы (Kir3.1/3.2). Световой стимул активирует опсин, который активирует эндогенные внутриклеточные белки G_i/o . Активированные белки $G\beta\gamma$, в свою очередь, открывают ионные GIRK-каналы, что приводит к электрическому ответу, который привязан во времени к световому стимулу и может быть зарегистрирован. Подробное описание способа см. в (van Wyk et al., PLoS Biol 2015)

2. Биолюминесцентный анализ специфичности в отношении $G\alpha$ с использованием планшет-ридера. Каждый опсин совместно экспрессировали с плазмидами, экспрессирующими репортер, в линии клеток HEK293. Аналогично анализу GIRK, активированные опсины активируют G-белки, которые, в свою очередь, ингибируют или активируют ферменты, способствующие образованию cAMP (G_s и G_i) или Ca^{2+} (G_q). Накопление этих продуктов (cAMP и Ca^{2+}) можно измерить по светоизлучающей способности биолюминесцентного белка, активируемого с помощью cAMP или Ca^{2+} соответственно. Для визуализации изменений активности G_s и G_i в качестве репортерной плазмиды использовали pcDNA5/FRT/TO-Glo22F, тогда как для изменения передачи сигнала, опосредованной G_q , в качестве репортерной плазмиды использовали pcDNA5/FRT/TO-mtAeq. В качестве субстрата добавляли люциферазу или целентеразин соответственно, и на изменения уровней cAMP (G_s и G_i) или Ca^{2+} (G_q) указывали изменения люминесценции, измеренной с помощью планшет-ридера Infinite F200Pro Тесап (Меннедорф, Швейцария). Для нормализации изменений светоиндуцированной флуоресценции относительно уровней трансфекции опсином абсолютные изменения флуоресценции делили на общую флуоресценцию репортера mCitrine в соответствующей лунке планшета, в котором проводятся измерения.

Ex vivo

Авторы настоящего изобретения регистрировали ответы на свет от нейронов сетчатки мышей в образцах сетчатки без фоторецепторных клеток (мышь с пигментным ретинитом *rd1*, линия мышей C3H/HeO_uJ), где эти опсиновые белки вводили в выжившую сетчатку с помощью генной терапии с использованием AAV (см. также van Wyk et al. (2015) и условные обозначения к фиг. 11 ниже).

In vivo

Авторы настоящего изобретения регистрировали поведенческие оптокинетические рефлексы в мышинных моделях с дегенерацией фоторецепторов, где эти опсиновые белки вводили в выжившую сетчатку с помощью генной терапии с использованием AAV (см. условные обозначения к фиг. 10 ниже).

Подробное описание графических материалов

Настоящее изобретение будет лучше понято, а цели, отличные от изложенных выше, станут очевидны при уделении внимания его последующему подробному описанию. В таком описании представлены ссылки на прилагаемые графические материалы, где показано следующее.

Фиг. 1. Общая структура опсина.

На фиг. 1 показано схематическое изображение общей структуры исходного опсина с семью трансмембранными доменами TM1-TM7, внеклеточными доменами - N-концевым NT и внеклеточными петлями EL1, EL2 и EL3, а также внутриклеточными доменами - C-концевым СТ и внутриклеточными петлями IL1, IL2 и IL3. Участки соединения между TM-доменами и внутриклеточными доменами на границе между мембраной и цитоплазмой указаны как участки соединения (a)-(g). Например, в этих участках соединения для замены внутриклеточных петель могут быть расположены необязательные сайты сплайсинга для получения химерного белка на основе опсина GPCR. Кроме того, указаны консервативный субдомен СТ - петля 8 (H8) в проксимальной области СТ, а также несколько консервативных мотивов последовательностей, присутствующих в опсинах, в частности:

- ионный замок между сайтом E(D)RY на цитоплазматической границе TM3, соединяющий его с глутаматным остатком (E) в участке соединения (f) между IL3 и TM6,
- хромофорсвязывающий карман с лизиновым остатком (K) в TM7, связанным с хромофором 11-цис-ретиналем через основание Шиффа, и отрицательным противоионом, обычно глутаматом, в TM3, стабилизирующим основание Шиффа,
- мотив NRxxY на C-конце TM7,
- один или несколько сайтов пальмитоилирования(S) на дистальном конце H8,
- C-концевые сайты фосфорилирования (P) в цитоплазматической области СТ.

Кроме того, на фиг. 1 в качестве примеров указаны три иллюстративных сайта усечения в СТ - (x-1), (x-2) и (x-3).

Изображенный сайт усечения (x-1) расположен на дистальном конце H8 и является смежным с дистальной стороны с пальмитоилированным цистеиновым остатком, соответствующим сайту пальмитоилирования в бычьем родопсине (S322 или S323). Изображенный сайт усечения (x-2) расположен ниже сайта пальмитоилирования, в случае меланопсина на 33 аминокислоты ниже сайта пальмитоилирования или на расстоянии до 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислот ниже мотива NR(K)Q. Изображенный сайт усечения (x-3) располагается в пределах мотива NR(K)Q или непосредственно дистальнее него. Другие не изображенные сайты усечения расположены, в частности, в аминокислотных положениях между (x-1) и (x-2) или между (x-3) и (x-1).

Фиг. 2. Схема иллюстративного химерного белка на основе опсина и GPCR.

На фигуре 2 показан иллюстративный вариант осуществления химерного белка на основе опсина и GPCR, для которого необходима лишь минимальная генная инженерия со всего лишь одним сайтом сплайсинга (x-1), где усеченный C-конец иллюстративного

исходного вышерасположенного опсина разрезан в положении, смежном с дистальной стороны с сайтом пальмитоилирования, и слит с СТ иллюстративного целевого GPCR; альтернативные иллюстративные сайты сплайсинга, такие как (x-2) и (x-3), указаны и описаны на фиг. 1.

Иллюстративный вариант осуществления, представленный на фиг. 2, дополнительно содержит дополнительные последовательности, которые могут быть необязательно добавлены на самом дистальном конце С-конца. Такие необязательные дополнительные последовательности могут кодировать маркерные белки (например, флуоресцентные белки) или последовательности для транспортировки (например, сигналы экспорта из аппарата Гольджи и ER или последовательности для мембранной транспортировки). В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления, которые здесь не показаны, необязательные дополнительные сайты сплайсинга могут быть введены вблизи участков соединения (A')-(G') между ТМ-доменами (ТМ1-ТМ7) и внеклеточными доменами (NT, EL1-EL3) для замены внеклеточных доменов на домены человеческого опсина для уменьшения антигенности белка в потенциальной терапии людей в случае применения опсинов, отличных от человеческих.

Фиг. 3. Иллюстративный вариант осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6.

(А). На фигуре 3 показан иллюстративный вариант осуществления химерного белка на основе меланопсина и GPCR mGluR6 с химерным С-концом, содержащим усеченный С-конец меланопсина вплоть до сайта пальмитоилирования (С) включительно, за которым в дистальном направлении вначале расположен смежный с дистальной стороны с сайтом пальмитоилирования полноразмерный СТ mGluR6, а затем после него расположены флуоресцентный маркер mKate2 и наконец дополнительный сигнал экспорта из аппарата Гольджи и последовательность для мембранной транспортировки родопсина, расположенная на самом дистальном конце целевого СТ. Кроме того, IL1 меланопсина была полностью замещена таковой из mGluR6 в сайтах разрезания и сплайсинга, расположенных в участках соединения а и b, тогда как полная IL3 из mGluR6 была введена в сайты сплайсинга, расположенные в высоковариабельной области более длинной IL3 меланопсина.

В этом иллюстративном варианте осуществления короткая IL3 из mGluR6 введена в наименее консервативную область более длинной IL3 меланопсина на том основании, что вариабельные области определяют функциональные различия, т. е. в данном случае потенциальную специфичность в отношении G-белка. Действительно, этот вариант осуществления с химерной IL3 опсина/mGluR6 обеспечивает повышенные функциональные возможности по сравнению с mela(palm)mGluR6, введенным в IL3 опсина, как продемонстрировано на фиг. 6В.

(В) вверху. Выравнивание генов меланопсина (OPN4) из различных видов (из DOI: 10.1371/Journal.pone.0025111), где показаны гипервариабельные области в IL3 между ТМ5 и ТМ6.

(В) внизу. Местоположение вставки IL3 из mGluR6. Стрелками, указывающими вниз, показаны сайты разрезания в используемом в данном случае мышинном меланопсине (М. OPN4), стрелками, указывающими вверх, показаны участки соединения e и f, показанные в А.

Фиг. 4. Иллюстративные варианты осуществления химерных белков на основе опсина и GPCR, которые нацелены на клеточную мембрану.

Для подтверждения надлежащей внутриклеточной транспортировки к плазматической мембране были созданы слитые белки опсин-mGluR6-mKate2, в которых для изучения локализации белка использовался флуоресцентный репортерный белок (mKate2). Слитые белки экспрессировались в клетках НЕК293. При сравнении изображений, полученных методом дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (А, В), с флуоресцентными изображениями (В, D) было подтверждено, что белки на основе опсина и mGluR6 локализовались в клеточной мембране. Это было показано с двумя различными химерными белками на основе опсина и GPCR, а именно с химерным GPCR меланопсин-mGluR6-mKate2 в (А, В) и с химерным GPCR опсин медузы-mGluR6-mKate2 в (С, D). У обоих химерных GPCR сайт усечения расположен так, что он является смежным с дистальной стороны с сайтом пальмитоилирования в СТ меланопсина.

Фиг. 5. Иллюстративные варианты осуществления химерного белка на основе опсина и mGluR6 с химерным С-концом, демонстрирующие усиленные светоактивируемые токи, опосредованные молекулами на основе опсина и mGluR6, по сравнению с исходным опсином.

Различные иллюстративные химерные конструкции на основе опсина и mGluR6 (в которых отсутствуют дополнительные последовательности для транспортировки) вводили путем транзientной трансфекции в линию клеток НЕК293, стабильно экспрессирующую GIRK1/2-каналы (калиевые каналы, которые напрямую открываются активированными G-белками из семейства Gi/o). При локальной фиксации потенциала на клетках в режиме фиксации напряжения (удерживающий потенциал -75 мВ) световой стимул с длиной волны 470 нм (1×10^{14} фотонов·см⁻²·с⁻¹), представляемый в течение 5 с, активирует входящий ток через GIRK, изображенный для данных вариантов на гистограммах. Указаны относительные величины токов через GIRK, активируемых различными конструкциями (нормализованные относительно величины во фрагменте клетки в пФ). Звездочками указаны уровни значимости, определяемые с помощью критерия Стьюдента (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).

(А) Токи через GIRK, индуцируемые опсином средневолновых колбочек (OPN1MW), были значимо меньшими, чем токи, индуцируемые химерным OPN1MW(palm)-mGluR6СТ.

(В) Сравнительные светоактивируемые токи через GIRK, опосредованные вариантами меланопсина, 1=немодифицированный меланопсин, 2=меланопсин, разрезанный в сайте пальмитоилирования, с добавлением СТ mGluR6, 3=дополнительно

полная IL1 меланопсина была замещена таковой из mGluR6, 4=дополнительно в переменное положение длинной IL3 меланопсина была помещена полная IL3 mGluR6. С-концевое добавление С-конца mGluR6 приводит к значимому усилению светоиндуцированных токов через GIRK.

Фиг. 6. Пример функционального скрининга *in vitro* химерных белков на основе опсина и GPCR с применением клеток HEK-GIRK.

Клетки HEK-GIRK, трансфицированные химерными молекулами на основе опсина и целевого GPCR, оценивали в отношении их способности активировать передачу сигнала, опосредованную G-белком Gi/o, как описано у Van Wyk et al. (2015). Показаны иллюстративные ответы на свет в виде кривых локальной фиксации потенциала, зарегистрированных для клеток HEK-GIRK, трансфицированных различными вариантами на основе опсина и GPCR, несущими в дополнение к СТ целевого GPCR также флуоресцентный белок mKate и дополнительные последовательности для экспорта из аппарата Гольджи и мембранной транспортировки (световой стимул представлен черными горизонтальными линиями; 470 нм; 1×10^{14} фотонов/с/см²). (A) Прототип Opto-mGluR6 (WO 2012/174674 A1 и van Wyk et al. (2015)), (B) Mela(palm+33AA)-mGluR6, (C) Mela(palm)+IL1-mGluR6, (D) Mela(palm)+IL3-mGluR6, (E) Mela(palm)-mGluR6, (F) JellyOP(palm)-mGluR6, (G) OPN1MW(palm)-mGluR6, (H) Mela(palm)-OPN1MW(IL1, IL2, IL3, СТ).

Фиг. 7. Эксперименты на планшет-ридере, в которых изучается перенацеливание G-белка и селективность иллюстративных вариантов осуществления химерных белков на основе опсина и GPCR в отношении сигнальных путей.

Авторы настоящего изобретения котрансфицировали клетки HEK293 плазидами, экспрессирующими репортер и химерные молекулы на основе опсина GPCR, и оценивали их специфичность в отношении Gα в биолюминесцентном анализе с использованием планшет-ридера. Аналогично анализу GIRK, активированные опсины активируют G-белки, которые, в свою очередь, ингибируют или активируют ферменты, способствующие образованию cAMP (Gs), снижению уровня cAMP (Gi/o) или увеличению уровня внутриклеточного Ca²⁺ (Gq). Накопление этих продуктов (cAMP и Ca²⁺) можно измерить по светоизлучающей способности биолюминесцентного белка, активируемого с помощью cAMP или Ca²⁺ соответственно. Воздействие света (480 нм, 10 секунд) указано черными стрелками. Для нормализации изменений светоиндуцированной флуоресценции относительно уровней трансфекции опсином абсолютные изменения флуоресценции делили на общую флуоресценцию репортера mCitrine в соответствующей лунке планшета, в котором проводятся измерения. Черными стрелками указана стимуляция светом. (A, B) Предпочтение для сопряжения с Gi/o (A) и Gq (B) у Mela(palm)-mGluR6 (черные кривые) и немодифицированного меланопсина (серые кривые). Следует отметить, что на (A) уровень внутриклеточного cAMP сначала повышали путем добавления форсколина (стимулирующего аденилатциклазу), так чтобы можно было измерить снижение уровня cAMP под действием светоактивируемого химерного белка. На графиках показано, что

замена С-конца меланопсина на таковой из mGluR6 в сайте пальмитоилирования приводит к сдвигу предпочтения в отношении G-белка от Gq (меланопсин) к Gi/o (mGluR6). Вставка С-конца mGluR6 в сайт пальмитоилирования меланопсина приводит к сдвигу предпочтения в отношении субъединицы G-альфа от Gq к Gi/o. (C) Предпочтение сопряжения с Gi/o в сравнении с Gs у немодифицированного JellyOP (серые кривые) по сравнению с JellyOP(palm)-mGluR6 (черные кривые). PTX является ингибитором Gi/o, что указывает на то, что JellyOP связывается только с Gs (отсутствие изменений в сигнале между случаями без добавления (●) и после добавления PTX (■)), тогда как JellyOP(palm)-mGluR6 явным образом связывается с Gi/o, что видно как разница в значениях яркости (Δ) между случаем до добавления PTX (●) и явным увеличением после добавления PTX (■). Вставка С-конца mGluR6 в сайт пальмитоилирования опсина медузы приводит к сдвигу предпочтения в отношении субъединицы G-альфа от Gs к Gi/o. (D) JellyOP(palm)-5HT7 эффективно активирует Gs, на что указывает светоактивируемое увеличение уровня cAMP. Контроль: клетки HEK293, экспрессирующие только mCitrine без светоактивируемого химерного белка. (E) JellyOP(palm)-5HT7, экспрессируемый в пирамидальных клетках передней поясной коры, снижает активность HCN-каналов и тем самым деполяризует мембранный потенциал. Этот эффект идентичен эффекту фармакологической стимуляции 5-HT7 (Santello et al. (2015)). Представлены данные (внизу) регистрации методом локальной фиксации соматических потенциалов (показанной сверху) в пирамидальных клетках из кратковременных срезов передней поясной коры мышей. JellyOP(palm)-5HT7 был введен с помощью генной терапии с использованием AAV-DJ путем стереотаксической инъекции.

Фиг. 8. Надлежащая транспортировка иллюстративных вариантов осуществления химерных вариантов на основе опсина и mGluR6 *in vivo* в дендриты и сигналы мGluR6 ON-биполярных клеток.

Мыши получали лечение с помощью генной терапии с использованием ssAAV2(7m8) (Dalkara et al. (2013)) и помещением гена молекулы на основе меланопсина и mGluR6 под контроль промотора 770En_454P(hGRM6) (EP19200082.6, прилагается к подаче настоящей заявки). (A) Схематическое изображение, указывающее на надлежащую субклеточную локализацию химерных белков на основе опсина и mGluR6 в дендритах ON-биполярных клеток, где также находится нативный mGluR6. (B) Mela(palm+33AA)-mGluR6-IRES-TurboFP635, визуализированный с помощью антитела к меланопсину (белым цветом), явным образом экспрессируется в дендритах ON-биполярных клеток. Аксоны, берущие начало в слое ганглионарных клеток (GCL), относятся к ipRGC (природно фоточувствительным ганглионарным клеткам сетчатки), в естественных условиях экспрессирующих меланопсин. Mela(palm)-mGluR6-mKate2 (C) и JellyOP(palm)-mGluR6-mKate2 (D), визуализированные с помощью антитела к RFP, и в этом случае явным образом указывают на дендритную локализацию белков. Opsin(palm)-версии являются достаточными для надлежащей локализации химерного белка в клетке-мишени.

Фиг. 9. Иллюстративные варианты осуществления химерных белков на основе

опсина и GPCR mGluR6 делают выделенные ON-биполярные клетки чувствительными к прямому свету.

Мыши получали лечение с помощью генной терапии с использованием Mela(palm+33AA)-mGluR6 и JellyOP(palm)-mGluR6, и образцы сетчатки после энуклеации расщепляли папаином. Выделенные клетки высевали на покровные стекла и изучали методом локальной фиксации потенциала с помощью методики локальной фиксации потенциала с перфорированием. (A) Биполярные клетки легко идентифицировались под оптическим прибором для DIC. (B) Трансфицированные биполярные клетки идентифицировали по совместной экспрессии флуоресцентного репортерного гена, в данном случае TurboFP635, визуализируемого под флуоресцентным микроскопом. (C, D) Иллюстративные результаты регистрации данных методом локальной фиксации потенциала от трансдуцированных ON-биполярных клеток в ответ на 2-секундное воздействие синего света (470 нм; 1×10^{14} фотонов на см^2 в секунду), указанное пунктирными вертикальными линиями. (C) Две наложенные иллюстративные кривые, показанные серым и черным цветом, от ON-биполярных клеток, экспрессирующих Mela(palm+33AA)-mGluR6. В ответ на свет клетки явным образом гиперполяризуются, что указывает на прямую активацию каскада mGluR6, осуществляющего отрицательное управление пропусканием неселективного катионного канала TRPM1. (D) Сравнительные кривые локальной фиксации потенциала от ON-биполярной клетки, экспрессирующей JellyOP(palm)-mGluR6 (черная кривая) и биполярной клетки палочки, напрямую активируемой фоторецепторами (серая кривая), регистрируемые на срезе сетчатки. Биполярные клетки, экспрессирующие JellyOP(palm)-mGluR6, демонстрировали чрезвычайно быструю кинетику с окончанием ответа ($\tau(\text{off})$) через 670 мс. Это практически идентично окончанию ответа у биполярной клетки при активации фоторецепторами (в данном примере $\tau(\text{off})=570$ мс). Также начало ответа для JellyOP(palm)-mGluR6 ($\tau(\text{on})=90$ мс) практически идентично началу ответа у биполярной клетки, активируемой фоторецепторами (70 мс). Эндогенная быстрая кинетика является четким свидетельством надлежащей локализации JellyOP(palm)-mGluR6 в сигналосоме mGluR6 и надлежащей передачи сигнала внутри биполярной клетки. Подобранные значения кинетических параметров (значения τ) указаны красными и зелеными линиями.

Фиг. 10. Результаты измерений *in vivo* остроты зрения слепых мышей, получавших лечение с помощью генной терапии с использованием AAV с иллюстративными вариантами осуществления химерных вариантов на основе опсина и mGluR6.

На гистограммах указаны средние показатели остроты зрения (\pm s.e.m.) у слепых мышей с пигментным ретинитом *rd1* (линии C3H/HeO_uJ с дегенерацией сетчатки), которые получали лечение с помощью генной терапии с использованием AAV с различными химерными конструкциями на основе опсина и mGluR6, обозначенными по оси x, где (palm) относится к сайту усечения, смежному с дистальной стороны с сайтом пальмитоилирования в СТ меланоопсина, опсина медузы и опсина средневолновых

колбочек, Mela(palm+33AA) относится к сайту усечения, смежному с дистальной стороны с аминокислотным положением 33 ниже сайта пальмитоилирования в СТ меланопсина, и где+IL1 или+IL3 относятся к наличию этих субъединиц mGluR6 в дополнение к СТ mGluR6, и, наконец, где JellyOP и OPN1MW относятся к опсину медузы и человеческому опсину средневолновых колбочек соответственно. C57BL/6 относится к не получавшим инъекцию зрячим мышам дикого типа и используется в качестве положительного контроля. В данном тесте мышь помещают без ограничений на приподнятую платформу в окружении устройства виртуальной реальности (Striatatech, барабана оптокинетической стимуляции), показывающего черные и белые вертикальные полосы с изменяющейся пространственной частотой (подробности см. в Prusky et al. (2004)). Отслеживание движений головы (оптомоторный рефлекс) мышей производится автоматически инфракрасной камерой и анализируется с целью количественного определения наивысшей пространственной остроты (цикл/град), все еще воспринимаемой мышами. Мыши, получавшие инъекцию Mela(palm)-mGluR6, демонстрировали значительно лучшие результаты, чем их слепые одноплетники (rd1). Все мыши, получавшие лечение с помощью варианта на основе меланопсина и mGluR6, демонстрировали одинаково хорошие результаты, равно как и мыши, получавшие инъекции JellyOP(palm)-mGluR6 и OPN1MW(palm)-mGluR6. Уровни значимости определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, и на графике уровни значимости указаны следующим образом: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, и n.s. - значимо не различаются. Говоря обобщенно, все конструкции демонстрировали одинаково хорошие результаты при значительном восстановлении пространственного зрения у слепых мышей rd1. Генную терапию проводили с использованием векторов ssAAV2(7m8) (Dalkara et al. (2013)), помещая гены химерных белков на основе опсина и mGluR6 под контроль промотора 770En_454P(hGRM6).

Фиг. 11. Ответы на свет ex vivo, зарегистрированные от ганглионарных клеток сетчатки в образцах сетчатки слепых мышей rd1, обработанных новыми конструкциями на основе опсина и mGluR6.

Регистрацию данных методом локальной фиксации потенциала с прикрепленной клеткой выполняли ex vivo на тотальных препаратах сетчатки. (А) Ганглионарные клетки сетчатки, меченные внутриклеточно после регистрации данных методом локальной фиксации потенциала для идентификации типа клеток. (В) Иллюстративный растровый график, на котором показаны импульсные ответы ганглионарной клетки сетчатки в сетчатке rd1, обработанной химерной молекулой Mela(palm+33AA)-mGluR6. Ответы не блокируются агонистом рецептора mGluR6 L-AP4 (25 мкМ), блокирующим входящий поток информации от фоторецепторов к ON-биполярным клеткам. Это подтверждает, что ответы на свет обусловлены Mela(palm+33AA)-mGluR6. Воздействие света применяли в течение 2 секунд между штриховыми линиями. Каждая горизонтальная линия вертикальных полос (пронумерованная 1-8) указывает на одну регистрацию данных. Каждая вертикальная линия соответствует зарегистрированному потенциалу действия

ганглионарной клетки. Явно видно, что в этой клетке весьма достоверно увеличивается возбуждение потенциала действия при воздействии света. (С) Иллюстративные гистограммы зависимости импульса от времени у временно OFF-, ON- и ON-OFF-ганглионарных клеток, восстановленных посредством экспрессии Mela(palm)-mGluR6 в сетчатке мыши rd1, которая в иных случаях является слепой. Восстановление естественного разнообразия ответов ганглионарных клеток на свет, т. е. увеличения частоты импульсов при окончании воздействия света (слева) в клетках, называемых OFF-клетками, увеличения частоты импульсов при начале воздействия света (в центре) в клетках, называемых ON-клетками, или увеличения возбуждения при начале и окончании воздействия света (справа) в клетках, называемых ON-OFF-клетками, подтверждает восстановление эндогенной функции внутренних слоев сетчатки. (D) Результаты регистрации данных с помощью многоэлектродной матрицы (MEA) из плоских препаратов сетчатки мышей rd1, трансдуцированных различными вариантами химерных белков на основе опсина и mGluR6. Показаны иллюстративные растровые графики (аналогичные B), полученные от выбранных электродов (пронумерованных 1-5) при периодической стимуляции светом (продолжительность стимуляции светом указана горизонтальными полосами над кривыми). rd1 относится к однопометникам, не получавшим лечение, у которых отсутствовали изменения базальной частоты возбуждения при стимуляции светом. В отличие от этого, все образцы сетчатки с химерными белками на основе опсина и mGluR6 демонстрировали явно выраженные светозависимые ответы.

Фиг. 12. Микрофотография вертикальных криосрезов сетчатки от двух получавших лечение мышей с дегенерацией (линии мышей rd1 с дегенерацией сетчатки C3H/HeOuj), на которой показаны ON-биполярные клетки, экспрессирующие hMela(palm)-mGluR6-IRES2-TurboFP635 после интравитреальной генной терапии с помощью AAV2, содержащего пептидные вставки (a) NLAPRTPHTAAR и (b) NLANHAPNHCAAR между N587 и R588 в вирусном гене VP1, кодирующем капсид AAV2. Экспрессия hMela(palm)-mGluR6-IRES2-TurboFP635 в обоих случаях находилась под управлением промотора 770En_454P(hGRM6), специфического для ON-биполярных клеток.

Фиг. 13. Иллюстративный химерный белок на основе опсина и GPCR JSR1(S186F)palm-beta2AR экспрессировали в клетках HEK293-GIRK, и измеряли светоиндуцированные токи с помощью способа локальной фиксации потенциала на целой клетке. Освещение при длине волны 385 нм индуцировало токи через GIRK, тогда как свет с длиной волны 550 нм вызывал прекращение активности вследствие бихроматической природы бистабильного мутанта JSR1 (S186F). В аналогичном эксперименте методом локальной фиксации потенциала с использованием того же освещения, проведенном с иллюстративным химерным белком на основе опсина и GPCR hJSR(S186F)palm-GABAB2, индуцировались аналогичные токи через GIRK (данные не показаны).

Последовательности кДНК и аминокислотные последовательности для выбранных **иллюстративных вариантов осуществления** химерного белка на основе опсина и GPCR5, которые представлены в обзоре в приведенной ниже таблице 3.

Таблица 3. Обзор иллюстративных вариантов осуществления с указанием исходных GPCR и С-концевого сайта сплайсинга и SEQ ID NO

Вариант осуществления	SEQ ID NO ¹⁾ и происхождение ²⁾	Название ^{3), 4)}	Исходный опсин	Исходный целевой GPCR	Положение сайта сплайсинга в СТ <u>целевого GPCR</u>
A	1; 2; m	Mela(palm+33AA)-mGluR6	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
B	3; 4; m	Mela(palm)-mGluR6	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
C	5; 6; m	Mela(palm+33AA)-mGluR6(IL1, CT)	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
D	7; 8; m	Mela(palm)-mGluR6(IL1, CT)	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
E	9; 10; m	Mela(palm+33AA)-mGluR6(IL3, CT)	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
F	11; 12; m	Mela(palm+33AA)-OPN1MW(IL1, IL2, IL3, CT)	меланопсин	OPN1MW	NR(K)Q=NRQ выше сайта сплайсинга: NRQFRN/CILHLF
G	13, 14; m	OPN1MW(palm)-mGluR6	OPN1MW	mGluR6	NR(K)Q=HPE
H	15; 16; h	Mela(palm+33AA)-mGluR6	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
I	17; 18; h	Mela(palm)-mGluR6 L-изоформа человеческого меланопсина, содержащая сигнал экспорта из аппарата Гольджи и метку 1D4	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
I	19; 20; h	Mela(palm)-mGluR6 P-изоформа человеческого	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE

		меланопсина, содержащая сигнал экспорта из аппарата Гольджи и метку 1D4			
I	21; 22 h	Mela(palm)-mGluR6 L-изоформа человеческого меланопсина, содержащая сигнал экспорта из аппарата Гольджи	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
I	23; 24; h	Mela(palm)-mGluR6 P-изоформа человеческого меланопсина, содержащая сигнал экспорта из аппарата Гольджи	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
I	25; 26; h	Mela(palm)-mGluR6 L-изоформа человеческого меланопсина без необязательных добавленных последовательностей на С-конце	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
I	27; 28; h	Mela(palm)-mGluR6 P-изоформа человеческого меланопсина, без необязательных добавленных последовательностей на С-конце	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE

J	29; 30; h	Mela(palm+33AA)-mGluR6(IL1, CT)	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
K	31; 32; h	Mela(palm+33AA)-mGluR6 (IL3, CT)	меланопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
L	33; 34; jf/m	JellyOP(palm)-mGluR6	опсин кубомедузы	mGluR6	NR(K)Q=HPE
M	35; 36; jf/m	JellyOP(palm)-5-HT7	опсин кубомедузы	5-HT-7	QYRNIN=сайт пальмитоилирован ия NR(K)Q=HKQ
N	37; 38 ppo/m	PPO(palm)-mGluR6	парапинопсин	mGluR6	NR(K)Q=HPE
O	39; 40; js/m	JSR1(palm)-mGluR6	родопсин паука- скакуна	mGluR6	NR(K)Q=HPE
P	41/42 h-JS/m	hJSR(S186F)palm-GABAB2-TS-1D4	hJSR(S186F)palm	GABAB2	NR(K)Q=NPD
Q	43/44 h-JS/m	hJSR(S186F)palm-beta2AR	JSR(S186F)palm	бета-2AR	NR(K)Q=IAFQ

¹⁾ Нечетные: последовательность нуклеиновой кислоты; четные: аминокислотная последовательность.

²⁾ Происхождение: m=мышинный; h=человеческий; jf=медузы; js=паука-скакуна; h-js=гуманизированный паука-скакуна

³⁾ Название указывает на исходные GPCR и сайт усечения в СТ вышерасположенного опсина путем ссылки на консервативный мотив или сайт, как в ⁴⁾, что касается целевого GPCR, то его домены перечислены, если в нем представлен не только СТ.

⁴⁾ В консервативном мотиве или сайте или относительно них; palm=сайт пальмитоилирования; palm+33AA=на 33 аминокислоты дистальнее сайта пальмитоилирования

В аминокислотных последовательностях, перечисленных ниже, аминокислоты, показанные в рамке, относятся к консервативным мотивам, а выделение серым цветом относится к пальмитоилированному Cys.

Вариант осуществления (A): Mela(palm+33AA)-mGluR6 (на основе мышинных последовательностей)

Конструирование: меланопсин был усечен после AA397, и был добавлен C-конец mGluR6, начиная с мотива NR(K)Q/HPE.

кДНК -- SEQ ID NO: 1

atggactctccttcaggaccaagagtctgtcaagcttaactcaggatcccagcttcacaaccagctcctgccctgcaaggcatttgaacg
gactcagaacgtctccgtaagagcccagcttctctctgttagccccacgacatctgcatcaggetgctgctgggtccccctccccaca
gtgatgtcccagaccatgctcactataccctaggcacggtgatcctgctggtgggactcacagggatgctgggcaatctgacggcatct
acacctctgcaggaacagaggctgaggacaccagcaaacatgttcatcatcaacctgcagtcagcgaacttctcatgtcagtcactc
aggccccggtcttcttccagcagcctctacaagaagtggctcttggggagacaggtgaggttctatgcttctgcggggctgtcttt
ggcatcacttccatgatcaccctgacagccatagccatggaccgctatctggtgatcacagtcactggccaccatcggcaggggatcc
aaaagacgaacggcactcgtcctgctaggcgtctggcttctgctggcctggagctgcccacttcttgggtggagtgcctacgtgcc
cgaggggctgctgacatctgctcctgggactacatgaccttcacaccccaggtgctgctacaccatgctgcttctgcttcttctt
ctccccctgctcatcatcttctgctacatcttctcagggccatccgagagacaggccgggctgtgagggctgcgggtgagtcce
ctctgcggcagaggcggcagtgagcggctgcagagtgagtggaagatggccaaggtcgcactgattgtcattcttctctctgctgctc
ctgggctcctactcactgtggctctggtggccttctgctggatactgcacatctgacgccctacatgagctcggtgccagccgtcatg
ccaaggtctgcatccacaatcccattatctacgccatcactcaccacaagtacagggtggccattgccagcactgccttgccttgg
ggtcttctcgggtgatcagggcagcgcagccaccctcctcagctaccgctctaccaccgctccacattgagcagccagtcctcagac
ctccatccagagcagaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcgccccgcccagagcagagaactca
gaggacgccaaagaagagcaggatcaccagcagggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgacagagaccag
cca

agtggcgctgctaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 2

MDSPSGPRVLSSLTQDPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAA
WVPFPTVDVPDHAHY

TLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRNRGLRTPANMFIINLAVSDFLMSVTQAPV
FFASSLYKKWLFGETGCEF

YAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYLVITRPLATIGRGSKRRTALVLLGVWLYALA
WSLPPFFGWSAYVPEGLLT

SCSWDYMTFTFPQVRA YTMLLFCFVFFLPLLIIIFCYIFIFRAIRETGRACEGCGESPL
RQRRQWQRLQSEWKMA

KVALIVILLFVLSWAPYSTVALVAFAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIH[NPIIY]AI
T[HPK]YRVAIAQHLP[CL]GVLL

GVSGQRSHPSLSYRSTHRSTLSSQSSDL[HPE]QNVQKRKRSLKKTSTMAAPPKSEN
SEDAKKSRLTSEGEYIPLD

QIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (B): Mela(palm)-mGluR6 (на основе мышинных последовательностей)

Конструирование: меланопсин был усечен после пальмитоилированного Cys меланопсина (AA364), и был добавлен C-конец mGluR6, содержащий две дополнительные проксимальные аминокислоты вследствие лучшего выравнивания последовательности по сравнению с прототипом Opto-mGluR6 (van Wyk M et al., 2015).

кДНК -- SEQ ID NO: 3

atggactctccttcaggaccaagagtcttgtcaagcttaactcaggatcccagcttcacaaccagtcctgcctgcaaggcatttggaaacg
gcactcagaacgtctcgcgaagagcccagcttctctctgttagccccacgacatctgcaatcaggtgctgctgggtccccctccccaca
gtcgatgtcccagaccatgctcactataccctaggcacggatgctgctggtgggactcacaggatgctgggcaatctgacggatcatc
acacctctgcaggaacagaggcctgaggacaccagcaaacatgttcatcatcaacctgcagtcagcgacttctcatgtagtctactc
aggccccgggtcttcttccagcagccttacaagaagtggctcttggggagacaggttgcgagttctatgccttctgcggggctgtcttt
ggcatcacttccatgatcacctgacagccatagccatggaccgctatctggtgatcacacgtccactggccaccatcgccaggggatcc
aaaagacgaacggcactcgtcctgctaggcgtctggcttctgacctggcctggagtctgccaccttcttgggtggagtgcctacgtgcc
cgaggggctgctgacatcctgctcctggactacatgaccttcacaccccaggtgctgctacaccatgctgcttctctcttcttctt
ctccccctgctcatcatcatcttctgctacatcttcatcttcagggccatccgagagacagggccggcctgtgagggctgcgggtgagtc
ctctgcggcagagggcagtgaggcagcggctgcagagtgagtggaagatggccaaggtcgcactgattgtcattcttctctctgctgct
ctgggctccctactccactgtggctctggtggccttctgctgatactgcacatcctgacgccctacatgagctcggtgccagccgtcatc
ccaaggtcttgccatccacaatcccattatctacgccatcactaccccaggtgaggtggccattgccagcactgccttgcctgttc
catccagagcagaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcggccccgcccaagagcagaaactcaga
ggacgccaaagaagagcaggatcaccagcaggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgacagagaccagcc
aag
tggcgctgcctaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 4

MDSPSGPRVLSLTDPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPF
PTVDVPDHAHY
TLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFRCNRGLRTPANMFIINLAVSDFLMSVTQAPVFFASS
LYKKWLFGETGCEF
YAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYLVITRPLATIGRGSKRRTALVLLGVWLYALAWSLPP
FFGWSAYVPEGLLT
SCSWDYMTFTFPQVRA YTMLLFCFVFFLPLLIIIFCYIFRAIRETGRACEGCGESPLRQRR
QWQRLQSEWKMA
KVALIVILLFVLSWAPYSTVALVAFAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIH[NPIIY]AIT[HPK]
[Y]RVAIAQHLP[CLF][HPE]
QNVQKRKRSLKKTSTMAAPPKSENSEDAKKSRTISEGEYIPLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (C): Mela(palm+33AA)+IL1-mGluR6 (на основе мышиных последовательностей)

Конструирование: так же, как для варианта осуществления A, но с дополнительной полной заменой IL1 меланопсина на IL1 mGluR6. Сайты разрезания идентичны таковым в прототипе Opto-mGluR6 (van Wyk M et al., 2015).

кДНК -- SEQ ID NO: 5

atggactctccttcaggaccaagagtcttgtaagcttaactcaggatcccagcttcacaaccagtcctgccctgcaaggcatttggaaacg
gcactcagaacgtctccgtaagagcccagcttctctctgttagccccacgacatctgcaatcaggetgctgctgggtccccctccccaca
gtcgtatgtcccagaccatgctcactataccctaggcacggtgatcctgctggtgggactcacagggatgctgggcaatctgacggatcatc
acacctcatgcgacacaacgacactcccatagtccgcgctctggccgtgagctttcatcatcaacctgcagtcagcgacttctcatg
tcagtactcaggccccggtcttcttggcagcagcctctacaagaagtggctcttggggagacaggttgcgagtctatgctcttgcgg
ggctgtcttggcatcacttccatgatcacctgacagccatagccatggaccgctatctggtgatcacacgtccactggccaccatcggc
aggggatccaaaagacgaacggcactgctctgtaggcgtctgctttatgccctggcctggagtctgccaccttcttgggtggagtgc
ctacgtgcccaggggctgctgacatcctgctctgggactacatgacctcacaccccaggtgctgctacacatgctgcttctgct
ttgtcttctctccccctgctcatcatcttctgctacatcttcatcttcagggccatccgagagacaggccggcctgtgagggtcgcg
gtgagtcctctgctggcagagggcggcagtgccagcggctgagagtgagtggaagatggccaaggctgcaactgattgtcatttctct
tcgtgctgctctggctccctactccactgtggctctggtggccttctgctggatactgcacatcctgacgccctacatgagctcggtgccag
ccgtcatgccaaaggtcttgcacatccacaatcccattatctacgccatcactaccccaagtagcaggggtggccattgccagcacctgcc
ttgccttgggggtcttctcggtgtatcaggccagcgcagccacccctccctcagctaccgctctaccaccgctccacattgagcagccagt
cctcagacctccatccagagcagaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcggccccgccccaaagagcg
agaactcagaggacgccaagaagagcaggatcaccagcgaggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaactgacag
ag
accagccaagtggcgcctgectaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 6

MDSPSGPRVLSLTLQDPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPF
PTVDVPDHAHY
TLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFMRHNDTPIVRASGRELFIINLAVSDFLMSVTQAPVFF
ASSLYKKWLFGET
GCEFYAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYLVITRPLATIGRGSKRRTALVLLGVWLYALA
WSLPPFFGWSAYVPE
GLLTSCSWDYMTFTPQVRA YTMLLFCFVFFLPLLIIFCYIFIFRAIRETGRACEGCGESPL
RQRRQWQRLQSEW
KMAKVALIVILLFVLSWAPYSTVALVAFAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAIT
HPKYRVAIAQHLPCL
GVLLGVSGQRSHPSLSYRSTHRSTLSSQSSDLHPEQNVQKRKRSLKKTSTMAAPPKSEN
SEDAKKSRLTSEGEY

IPLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (D): Mela(palm)+IL1-mGluR6 (на основе мышинных последовательностей)

Конструирование: меланопсин был усечен после пальмитоилированного Cys меланопсина (AA364), и был добавлен С-конец mGluR6, содержащий две дополнительные проксимальные AA по сравнению с прототипом Opto-mGluR6 (van Wyk M et al., 2015).

кДНК -- SEQ ID NO: 7

atggactctccttcaggaccaagagtcttgtcaagcttaactcaggatcccagctcacaaccagtcctgcctgcaaggcatttggaaacg
gactcagaacgtctccgtaagagcccagcttctctgttagccccacgacatctgcatcaggetgctgctgggtccccctccccaca
gtcgtatgtcccagaccatgctcactataccctaggcacggtgatcctgctggtgggactcacagggatgctgggcaatctgacggatcatc
acaccttctgcaggaacagaggcctgaggacaccagcaaacatgttcatcatcaacctgcagtcagcgaacttctcatgtcagtcactc
aggccccgggtcttcttccagcagccttacaagaagtggctcttggggagacaggttgcgagttctatgcttctgcggggctgtcttt
ggcatcacttccatgatcaccctgacagccatagccatggaccgctatctggtgatcacacgtccactggccaccatcggcaggggatcc
aaaagacgaacggcactcgtcctgctaggcgtctggcttctgctggcctggagctgcccacttcttgggtggagtgcctacgtgcc
cgaggggctgctgacatctgctcctgggactacatgacctcacaccccaggtgcgtgctacaccatgctgcttctgcttcttctt
ctccccctgctcatcatcatcttctgctacatcttcatcttcagggccatccgagagacaggccgggctgtgagggtgcgggtgagtc
ctctgcggcagaggcggcagtgaggcggctgcagagtggatggaagatggccaaggtcgactgattgtcattcttctctctgctgctc
ctgggctcctactcactgtggctctggtggccttctgctggatactgcacatcctgacgccctacatgagctcggtgccagccgctatcg
ccaaggtcttgcctccacaatcccattatctacgccatcactacccccaggtggccattgcccagcactgccttgcctgttc
catccagagcagaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcggccccgcccaagagcgagaactcaga
ggacgcccaagaagagcaggatcaccagcaggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaactgacagagaccagcc
aag

tggcgctgcctaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 8

MDSPSGPRVLSLTQDPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPF
PTVDVPDHANY
TLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFMRHNDTPIVRASGRELFIINLAVSDFLMSVTQAPVFF
ASSLYKKWLFGET
GCEFYAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYLVITRPLATIGRGSKRRTALVLLGVWLYALA
WSLPPFFGWSAYVPE
GLLTSCSWDYMTFTPQVRAYTMLLFCFVFFLPLLIIFCYIFIFRAIRETGRACEGCGESPL
RQRRQWQRLQSEW
KMAKVALIVILLFVLSWAPYSTVALVAFAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAIT
HPKYRVAIAQHLPCL
FHPEQNVQKRKRSLLKKTSTMAAPPKSENSEDAKKSRITSEGEYIPLDQIDINVTETSQV

APA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (E): Mela(palm+33AA)+IL3-mGluR6 (на основе мышиных последовательностей)

Конструирование: так же, как для (1), но с дополнительной вставкой короткой IL3 mGluR6 в варибельную часть длинной IL3 меланопсина.

кДНК -- SEQ ID NO: 9

atggactctccttcaggaccaagagtcttgtcaagcttaactcaggatcccagcttcacaaccagtcctgcctgcaaggcatttggaaacg
gcactcagaacgtctcgcgaagagcccagcttctctctgttagccccacgacatctgcaatcaggetgctgctgggtccccctccccaca
gtcgatgtcccagaccatgctcactataccctaggcacggtgatcctgctggtgggactcacagggatgctgggcaatctgacggatcatc
acacctctgcaggaacagaggcctgaggacaccagcaaacatgttcacatcaacctgcagtcagcgaacttctcatgtcagtcactc
aggccccgggtcttcttccagcagcctctacaagaagtggctcttggggagacaggttgcgagttctatgccttctgcggggctgtcttt
ggcatcacttccatgatcacctgacagccatagccatggaccgtatctggtgatcacagtcactggccaccatcggcaggggatcc
aaaagacgaacggcactcgtcctgctaggcgtctggcttctatgcctggcctggagctgcccacttcttgggtggagtgcctacgtgcc
cgaggggctgctgacatcctgctcctgggactacatgaccttcacaccccaggtgcgtgctacaccatgctgcttctctgttcttct
cctccccctgctcatcatcatcttctgctacatcttcatcttcagggccatccgagagacaggccggggtgtgccagagaccttcaatgaag
cccctctgcggcagagggcggcagtgccagcggctgcagagtgagtggaagatggccaaggctgcactgattgtcattcttctctctgctg
gtcctgggctccctactcactgtggtctggtggccttctggtgatactcgcaatcctgacgccctacatgagctcgggtgccagccgta
tcgccaaggcttctgccatccacaatcccattatctacgccatcactcaccccaagtaacagggtggccattgccagcactgccttgcctt
gggggtcttctcgggtgatcagggcagcgcagccaccctccctcagctaccgctctaccaccgctccacattgagcagccagtcctcag
acctccatccagagcagaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcggccccgcccaagagcgcgagaact
cagaggacgcccaagaagagcaggatcaccagcggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgacagagacc
agc
caagtggcgcctgcctaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 10

MDSPSGPRVLSLTQDPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPF
PTVDVPDHANY
TLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRNRGLRTPANMFIINLAVSDFLMSVTQAPVFFASS
LYKKWLFGETGCEF
YAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYLVITRPLATIGRGSKRRTALVLLGVWLYALAWSLPP
FFGWSAYVPEGLLT
SCSWDYMTFTPQVRA YTMLLFCFVFFLPLLIIIFCYIFIFRAIRETGRGVPETFNEAPLRQR
RQWQRLQSEWKM
AKVALIVILLFVLSWAPYSTVALVAFAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIH[NPIIY]AIT[HP]
[K]YRVAIAQHLP[CL]GV
LLGVSGQRSHPSLSYRSTHRSTLSSQSSDL[HPE]QNVQKRKRSKKTSTMAAPPKSENSED

AKKSRLTSEGEYIPL**DQIDINVTETSQVAPA**

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (F): Mela(palm)-OPN1MW(IL1, IL2, IL3, CT) (на основе мышинных последовательностей)

Конструирование:

химерная молекула с заменой всех внутриклеточных доменов mela на соответствующие внутриклеточные домены OPN1MW с сайтом сплайсинга X-1 в CT (фиг. 3, вариант 1)

кДНК -- SEQ ID NO: 11

atggactctccttcaggaccaagagtcttgtcaagcttaactcaggatcccagcttcacaaccagctcctgcctgcaaggcatttggaaacg
gcactcagaacgtctccgtaagagcccagcttctctctgttagccccacgacatctgcacatcaggctgctgctgggtccccctccccaca
gtcgtatgtcccagaccatgctcactataccctaggcacggtgatcctgctggtgggactcacagggatgctgggcaatctgacggatcatc
acgccaccatgagattcaagaagctgcgcatccagcaaacatgttcatcatcaacctcgagtcagcgacttctctcatgctcagtcactca
ggccccgggtcttcttggcagcagcctctacaagaagtggctcttggggagacaggttgcgagttctatgccttctgctggggctgtctttg
gcatcacttccatgatcacctgacagccatagccatggaccgctatctggtgatctgcaagcccttggcaatgtgagatttgatgctaa
gctgacggcactgctctgtaggcgtctggtttatgcctggcctggagtctgccaccttcttgggtggagtgcctacgtgcccggagg
gctgctgacatctgctcctgggactacatgaccttcacaccccaggtgcgtgctacaccatgctgctcttctgcttcttctctcccc
ctgctcatcatcttctgctacatccaagtgtggctggccatccgagcagtgccaagcaacagaaagaatctgagtcactcagaag
gccgagaaggaggtgacaaggctgcactgattgtcattcttctctctgctgctcctgggctcctactcactgtggctctggtggcctt
gctggatactcgacatcctgacgcctcatgagctcggtgccagcctgcatcgccaaggcttctgccatccacaatcccattatctacg
ccatcactcaccacaagtagcagggtggccattgcccagcactgccttgcaactgcatcttacatctcttggaaagaagggtgatgatag
ctctgaaacttccagcactccaagacagaagtctcatctgtctctcagtgctacctgcataa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 12

MDSPSGPRVLSSLTQDPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPF
PTVDVPDHANY
TLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYATMRFKCLRHPANMFIINLAVSDFLMSVTQAPVFFASS
LYKKWLFGETGCE
FYAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYLVICKPFGNVRFDAKLTALVLLGVWLYALAWSLP
PFFGWSAYVPEGLL
TSCSWDYMTFTPQVRAYTMLLFCFVFFLPLLIIFCYIQVWLAIKAVAKQOKESESTOKA
EKEVTKVALIVILLFV
LSWAPYSTVALVAFAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAITHPKYRVAIAQHLPC
NCILHLFGKKVDDS
SELSSTSKTEVSSVSSVSPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=OPN1MW

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (G): OPN1MW(palm)-mGluR6 (на основе мышинных последовательностей)

Конструирование: С-конец mGluR6, содержащий мотив HPE, был добавлен к предполагаемому сайту пальмитоилирования, т. е. за остатком (F, выделенным серым цветом) непосредственно перед сайтом пальмитоилирования С322 в бычьем родопсине.

кДНК -- SEQ ID NO: 13

atgccccaaaggttacaggtgaacagacactggaccactatgaggatagcaccatgcaagcatctcacctataccaacagcaaca
gcaccaaaaggtcccttgaaggcccaattatcacattgctcccaggtgggtgtaccacctcaccagcactggatgattcttgggtcgtt
gcatctgtcttactaatggacttgtgctggcagccaccatgagattcaagaagctgcgcatccactgaactggattctggtgaactgg
cagttgctgacctagcagagaccattattgccagcactatcagtgttgaaccaaacttatggctactcgttctgggacaccctctgtgt
gtcattgaaggctacattgtctcattgtgtggaatcacaggcctctggctccctggccatcattcctgggagagatggctggtggtctgcaa
gcccttggcaatgtgagattgatgctaagctggccactgtgggaatcgtcttctcctgggtctgggctgctatatggacggccccacca
tctttggttgagcaggtactggccttatggcctgaagacatcctgtggccagacgtgttcagcggctacctcgtaccccggttcagtct
tatatgatggtcctcatggtcacgtgctgcatctcccactcagcatcatcgtgctctgctacctccaagtggctggccatccgagcagtg
gcaaagcaacagaaagaatctgagtcactcagaaggccgagaaggaggtgacacgcatggtggtggtgatggtcttcgatactgcc
tctgctggggaccctatacttcttctgcatgcttctgctactgccaccctggctatgccttccaccctcttggcctcctaccatcctactt
gccaaaagtgccactatctacaacccattatctatgctttatgaaccggcagtttcgaaactgcatcttacctcttcatccagagca
gaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcggccccgccaagagcggagaactcagaggacgccaag

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 14

MAQRLTGEQTLDHIEDSTHASIFTYTNSNSTKGFEGPNYHIAPRWVYHLLTSTWMILVV
VASVFTNGLVLA
TMRFKKLRHPLNWILVNLA VADLAETIIASTISVVNQIYGYFVLGHPLCVIEGYIVSLCGI
TGLWSLAISWERWL
VVCKPFGNVRFDAKLATVGIVFSWVWAAIWTAPPIFGWSRYWPYGLKTSCGPDVFSGT
SYPGVQSYMMVL
MVTCCIFPLSIIVLCYLQVWLAIKAVAKQKQKESESTQKAEKEVTRMVVVMVFAYCLCW
GPYTFFACFATAHP
GYAFHPLVASLPSYFAKSATIY NPIIY VFM NRQ FRNCILHLF HPE QNVQKRKRSLKKTST
MAAPPKSENSEDA
KKSRLTSEGEYIPLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=mGluR6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (H): Mela(palm+33AA)-mGluR6 (на основе

человеческих последовательностей)

Конструирование: так же, как указано выше для мышиной конструкции.

кДНК -- SEQ ID NO: 15

atgaacctccttcggggccaagagtctgccagcccaaccaagagcccagctgcatggccaccccagcaccaccagct
 ggtggga
 cagctcccagagcagcatctccagcctgggccggcttccatccatcagtcccacagcactgggacttggctgctgctgggt
 cccctc
 cccacggttgatgttccagaccatgcccactatacctgggcacagtgatcttctggtgggactcacgggatgctgggcaac
 ctgacg
 gtcactataccttctgcaggagcagaagcctccggacacctgccaacatgttcattatcaacctgcggtcagcgacttctcatgtcctt
 caccagggccctgtcttctcaccagtagcctctataagcagtggtcttctggggagacaggctgcgagttctatgcttctgtggagctc
 tcttggcatttctccatgatcacctgacggccatcgccctggaccgctacctggaatcacacgcccgctggccaccttgggtggcgt
 ccaagaggcgtgcgccatttctctgctgggcgttggctctatgccctggcctggagctctgccaccttctcggtggagcgcctactgt
 cccgaggggtgctgacatcctgctcctgggactacatgagcttcacgcccggcgtgctgctacaccatgcttctctgctgcttctgttc
 ttctcctctgcttatcatctactgctacatcttcatcttcagggccatccgggagacaggacgggctctccagacctcggggcctgc
 aagggcaatggcgagtcctgtggcagcggcagcggctgcagagcagtgcaagatggccaagatcatgctgctggtcatcctctctt
 cgtgctctctgggtccctattccgctgtggccctgtggccttctggtgacgcacacgtctgacacctacatgagctcggtgccag
 ccgctatgccaaggcctctgcaatccacaacccatcattacgccatccccacccaagtaagggtggccattgccagcacctgc
 cctgctgggggtgctgctgggtgatcacgccgcacagtgcacctaccccagctaccgctccaccaccgctccacgctgaccagcc
 acacctcaacctccatccagagcagaatgtgcagaagcgaagcggagcctcaaggccacctccacggtggcagccccacccaaggg
cgaggatgcagaggcccacaagaagagcaggatcaccagcggggcagtagacatccccctggaccagatcgacatcaactgac
ag
agaccagccaagtggcgctgectaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 16

MNPPSGPRVLPSTQEPSCMATPAPPSWWSSQSSISLGRGPSISPTAPGTWAAAWVPL
 PTVDVPDHAH
 YTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRSRSLRTPANMFIINLAVSDFLMSFTQAPVFFTSS
 LYKQWLFGETGCEF
 YAFCGALFGISSMITLTAIALDRYLVITRPLATFGVASKRRAAFVLLGVWLYALAWSLPP
 FFGWSAYVPEGLLTS
 CSWDYMSFTPAVRAVTMLLCCFVFFLPLLIIYCYIFIFRAIRETGRALQTFGACKGNES
 LWQRQLQSECKM
 AKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVAFAGYAHVLTTPYMSSVPAVIAKASAIH[NPIIY]AITH
 [PK]YRVAIAQHLP[CLG]
 VLLGVSRRHSRPYSYRSTHRSTLTSHTSNL[HPE]QNVQKRKRSKATSTVAAPPKGEDA
EAHKKSRLTSEGEYI
PLDQIDINV TETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал**

экспорта из аппарата Гольджи

Выделено жирным шрифтом=необязательный эпитоп 1D4

Вариант осуществления (I): Mela(palm)-mGluR6 (на основе человеческих последовательностей)

Конструирование: так же, как указано выше для мышинной конструкции.

Аллельный вариант: "L-вариант"

кДНК -- SEQ ID NO: 17

atgaacctctctcggggccaagagtcctgcccagcccaaccaagagcccagctgcatggccaccccagcaccaccagctggtggg
 a
 cagctcccagagcagcatctccagcctgggcccggcttccatccatcagtcccacagcacctgggacttgggctgctgctgggtcccctc
 cccacggttgatgttccagaccatgccactataacctgggacagtgatcttctgctggggactcacggggatgctgggcaacctgacg
 gtcactataccttctgcaggagcagaagcctccggacacctgccaacatgttcattatcaacctgcgggtcagcgacttctcatgctctt
 caccagggcccctgtcttctcaccagtagcctctataagcagtggtcttctgggagacaggctgcgagttctatgcttctgtggagctc
 tctttggcatttctccatgatcacctgacggccatgcacctggaccgctacctggtaacacacgcccgtggccaccttgggtggcgt
 ccaagaggcgtgcccatttctctgctgctgggcgtttggctctatgccctggcctggagctctgccaccttctcggtggagcgcctacgtg
 cccgaggggtgctgacatcctgctcctgggactacatgagcttcacgcccggcgtgctgctacacatgcttctctgctgcttctgttc
 ttctcctctgcttatcatctactgctacatcttcatcttcagggccatccgggagacaggacgggctctccagaccttcggggcctgc
 aagggaatggcgagtcctgtggcagcggcagcggctgcagagcagtgcaagatggccaagatcatgctgctggtcatcctctctt
 cgtgctctctgggtccctattccgctgtggccctgggtggccttctgctgggtacgcacacgtctgacacctacatgagctcggtgccag
 ccgctcatgccaaggcctctgcaatccacaacccatcatttacgccaaccccccaagtaacaggggtggccattgccagcacctgc
 cctgctgttccatccagagcagaatgtgcagaagcgaagcggagcctcaaggccacctccacggtggcagccccacccaaggggcga
ggatgcagagggcccacaagaagagcaggatcaccagcggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgacaga
 ga
 ccagccaagtggcgcctgectaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 18

MNPPSGPRVLPSPPTQEPSCMATPAPPSWWDSSQSSISLGRLPISPTAPGTWAAAWVPL
 PTVDVPDH
 AHYTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCSRSLRTPANMFIINLAVSDFLMSFTQAPVFFT
 SSLYKQWLFGE
 TGCEFYAFCGALFGISSMITLTAIALDRYLVITRPLATFGVASKRRAAFVLLGVWLYALA
 WSLPPFFGWSAY
 VPEGLLTSCSWDYMSFTPAVRAVTMLLCCFVFFLPLLIICYIFIFRAIRETGRALQTFGA
 CKGNGESLWQR
 QRLQSECKMAKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVAFAGYAHVLTPTYMSSVPAVIAKASAI
 HNPPIYAITHPKY
 RVAIAQHLPCLFHPEQNVQKRKRSLKATSTVAAPPKGEDAEAHKKSRLITSEGEYIPLDQ
IDINVTETSQVA
 PA

Аллельный вариант: P-вариант

кДНК SEQ ID NO: 19 (с изоформой 1 человеческого меланопсина)

atgaaccctccttcggggccaagagtccgcccagcccaaccaagagcccagctgcatggccaccccagcaccaccagctgggtg
 ggacagctcccagagcagcatcctcagcctggggccggttccatccatcagctcccacagcactgggacttgggctgctgctgggtc
 cccctccccacggttgatgttccagaccatgccactataacctggggcacagtgatcttctgctggggactcacgggatgctgggca
 acctgacggctcatctatacctctgcaggagcagaagcctccggacacctgccaacatgttcattatcaacctcgcggtcagcgactt
 cctcatgtccttaccagccctgtcttctcaccagtagcctctataagcagtggtcttggggagacaggctgcgagttctatgc
 ctctgtggagctctcttggcatttctccatgatcacctgacggccatgcctggaccgctacctggaatcacacgcccgcctggc
 caccttgggtggtgccaagaggcgtgcggcatttgcctgctggcgcttggctctatgccctggcctggagtctgccacccttctt
 cggtggagcgcctacgtgcccaggggtgctgacatcctgctcctgggactacatgagcttcacgcccggcctgctgcctacacc
 atgcttctgctgcttctgcttctcctcctctgcttcatcatctactgctacatcttcatctcagggccatccgggagacaggacg
 ggctctccagacctcggggcctgcaagggcaatggcgagtccctgtggcagcggcagcggctgagagcgagtgcaagatggcca
 agatcatgctgctgctcctcctctctgctcctgggctccctattccgctgtggccctggcttctgctgggtacgcacacgt
 cctgacacctacatgagctcgggtgccagccgctcatgccaaggcctctgcaatccacaaccccatcattacgccatccccacccc
 aagtacagggtggccattgccagcacctgccctgcttccatccagagcagaatgtgcagaagcgaagcggagcctcaaggc
cacctccacggtggcagccccaccaagggcgaggatgcagaggccccacaagaagagcaggatcaccagcagggcgagtaca
tccccctggaccagatcgacatcaactgacagagaccagccaagtggcgctgcctaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 20

**Последовательность AA молекулы на основе меланопсина и mGluR6 с
 изоформой 1 человеческого меланопсина ("Р-вариант")**

MNPPSGPRVPPSPTQEPSCMATPAPPSWWSSQSSISLGRPLSISPTAPGTWAAAWVPL
 PTVDVPDH
 AHYTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCSRSLRTPANMFIINLAVSDFLMSFTQAPVFFT
 SSLYKQWLFGE
 TGCEFYAFCGALFGISSMITLTAIALDRYLVITRPLATFGVASKRRAAFVLLGVWLYALA
 WSLPPFFGWSAY
 VPEGLLTSCSWDYMSFTPAVRAAYTMLLCCFVFFLPLLLIYCYIFIFRAIRETGRALQTFGA
 CKGN GESLWQR
 QRLQSECKMAKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVAFAGYAHVLTPTMSSVPAVIAKASAI
 HNPITYAITHPKY
RVAIAQHLPCLFHPEQNVQKRKRSLKATSTVAAPPKGEDAEANKKSRLTSEGEYIPLDQ
IDINVTETSQVA

РА

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал**
экспорта из аппарата Гольджи

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Показано в рамке=аллельный вариант и консервативные мотивы

Комментарий: в сравнительных экспериментах в клетках HEK293 L- и P-варианты демонстрировали одинаковый результат. P-вариант является наиболее распространенным аллельным вариантом mGluR6 и использовался в большинстве экспериментов.

Вариант осуществления (J): Mela(palm+33A)+IL1-mGluR6 (на основе человеческих последовательностей)

Конструирование: так же, как указано выше для мышинной конструкции.

кДНК -- SEQ ID NO: 29

atgaaccctccttcggggccaagagtctgccagcccaaccaagagcccagctgcatggccaccccagcaccaccagctggtggg
 а
 cagctcccagagcagcatctccagcctgggccggcttccatccatcagtcccacagcacctgggactgggctgctgctgggtccccctc
 cccacgggtgatgttccagaccatgccactataccctgggcacagtgatcttctgctggggactcacggggatgctgggcaacctgacg
 gtcactataccttccggtacaacaacacgcccatcctcggggcctcgggccgagagctcttcattatcaacctgcggtcagcgacttct
 catgtccttaccagggccctgtcttcttaccagtagcctctataagcagtggtctttggggagacaggctgcgagttctatgccttctg
 tggagctctcttggcatttctccatgatcacctgacggccatcgccctggaccgctacctggtaatcacagcccgctggccaccttg
 gtgtggcgtccaagaggcgtgcggcatttgcctgctgggcgtttggctctatgcctggcctggagctgccacccttctcggtggagc
 gcctacgtgccgaggggtgctgacatcctgctcctgggactacatgagcttccgcccgtgcgtgctacacccatgcttctctgctg
 ctctggttcttctcctctgcttcatcatctactgctacatcttcatcttcaggccatccgggagacaggacgggctctccagacctc
 ggggcctgcaagggcaatggcgagtccctgtggcagcggcagcggctgcagagcgagtcaagatggccaagatcatgctgctggtca
 tctctcttctgctctctctgggctcctattccgctgtggccctggtggccttctgctgggtacgcacacgtcctgacacctacatgagctc
 ggtgccagccgctatcgccaaggcctctgcaatccacaaccccatctttacgccatcaccaccccaagtacagggtggccattgcca
 gcacctgccctgctgggggtgctgctgggtgatcacgccggcacagtgcgccctaccccagctaccgctccaccaccgctccacgct
 g
 accagccacacctccaacctccatccagagcagaatgtgcagaagcgaagcggagcctcaaggccacctccacggtggcagccccac
ccaagggcgaggatgcagagggccacaagaagagcaggatcaccagcggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatca
ac
gtgacagagaccagccaagtggcgctgctctaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 30

MNPPSGPRVLPSTQEPSCMATPAPPSWWDSQSSISLGRPLPSISPTAPGTWAAAWVPL
 PTVDVPDHAH
 YTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFRYNNTPIVRASGRELFIIINLAVSDFLMSFTQAPVFF
 TSSLYKQWLFGETG
 CEFYAFCGALFGISSMITLTAIALDRYLVITRPLATFGVASKRRAAFVLLGVWLYALAWS
 LPPFFGWSAYVPEGL
 LTSCSWDYMSFTRPAVRAITMLLCCFVFFLPLLIICYIFIFRAIRETGRALQTFGACKGN
 GESLWQRQRLQSEC
 KMAKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVAFAGYAHVLTPTMSSVPAVIAKASAIH[NPIIY]AI
 T[HPK]YRVAIAQHLP
 [C]LGVLLGVSRHRSRYPYSYRSTHRSTLTSHSTNL[HPE]QNVQKRKRS�KATSTVAAPPKG
EDAEAHKKSRTSEG
EYIPLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал**

экспорта из аппарата Гольджи

Выделено жирным шрифтом=необязательный эпитоп 1D4

Вариант осуществления (К): Mela(palm+33A)+IL3-mGluR6 (на основе человеческих последовательностей)

Конструирование: химерная молекула на основе человеческого меланопсина с IL3 mGluR6 (GRM6) и СТ mGluR6 (GRM6)

кДНК -- SEQ ID NO: 31

atgaacctctctcggggccaagagtctgccagcccaacccaagagcccagctgcatggccaccccagcaccaccagctggtggg
 а
 cagctcccagagcagcatctccagcctgggcccgttccatccatcagtcccacagcacctgggacttgggctgctgctgggtcccctc
 cccacggttgatgttccagaccatgccactataacctgggcacagtgatcttctgctgggactcacggggatgctgggcaacctgacg
 gtcactataccttctgcaggagcagaagcctccggacacctgccaacatgttcattatcaacctgcgggtcagcgacttctcatgctctt
 caccagggcccctgtcttctcaccagtagcctctataagcagtggtcttctgggagacaggctgcgagttctatgcttctgtggagctc
 tctttggcatttctccatgatcacctgacggccatcgcctggaccgctacctggtaatcacacgcccgtggccaccttgggtggcgt
 ccaagaggcgtgcccatttctctgctgggcgtttggctctatgccctggcctggagctctgccaccttctcggtggagcgcctacgtg
 cccgaggggtgctgacatcctgctcctgggactacatgagcttcacgcccggcgtgctgcctacaccatgcttctctgctgcttctgctt
 ttctcctctgcttatcatctactgctacatcttcatcttcagggccatccgggagacaggacggggcgtgcccagacctcaacga
ggccaagggaatggcgagtcctctgtggcagcggcagcggctgcagagcgagtgcaagatggccaagatcatgctgctggtcctcc
 tctctgctctctcggctccctattccgctgtggccctggtggccttctgctgggtacgcacacgtcctgacacctacatgagctcgggtg
 cagccgtcatgccaaaggcctctgcaatccacaacccatcatttacgccatcacccacccaagtacagggtggccattgcccagcacc
 tgccctgctgggggtgctgctgggtgtatcacgccggcacagtcgcccctaccccagctaccgctccaccaccgctccacgctgacca
 g
 ccacacctccaacctccatccagagcagaatgtgcagaagcgaaagcggagcctcaaggccacctccacggtggcagccccaccaag
ggcgaggatgcagagggcccacaagaagagcaggatcaccagcggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtg
 ас
 agagaccagccaagtggcgcctgectaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 32

MNPPSGPRVLPSTQEPSCMATPAPPSWWSSQSSISLGRLPISPTAPGTWAAAWVPL
 PTVDVPDHAH
 YTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRSRSLRTPANMFIINLAVSDFLMSFTQAPVFFTSS
 LYKQWLFGETGCEF
 YAFCGALFGISSMITLTAIALDRYLVITRPLATFGVASKRRAAFVLLGVWLYALAWSLPP
 FFGWSAYVPEGLLTS
 CSWDYMSFTPAVRAVTMLLCCFVFFLPLLIICYIFIFRAIRETGRGVPETFNEAKGNES
 LWQRQRLQSECK
 MAKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVAFAGYAHVLTPLYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAIT
 HPKYRVAIAQHLPCL
 GVLLGVSRRHSRPYPSYRSTHRSTLTSHTSNLHPEQONVQKRKRSLKATSTVAAPPKGED
AEAHKKSRTISEGEY
IPLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (L): JellyOP(palm)-mGluR6

Конструирование: химерная молекула на основе опсина кубомедузы с С-концом мышинового GRM6, добавленным за сайтом пальмитоилирования (Cys, выделенным серым цветом) JellyOP

кДНК -- SEQ ID NO: 33

atgggagcgaatataacagaaatattgtcaggcttttagcttgtgtagtagtattctctctataagcttgaatatgatagttctaattacat
accgcttacgacataaattggctttaaagatgctctcatggctagtagtggcgttcagtgatggtgtacaagctatcgtaggatatcctttag
aggattactgtagtagacggaatggacattcggaaatgaattatgcaagttgcaggattttcattactgcccttggcgaagttcc
atcgctcatctcactgctctgccttagatcgatacttcacagtggtgcagaccttcgtggcaactgcgattcacggatcaatgagaaatgc
aggatggatcatattgttctgctggttctacgctcctctgggagctctacccttagttggatgggcaaatatgacgtggagggtgacgg
tatgcatgctccatcaactggcagacgacagtcctaaaagctactcatacagggtttgttattcgtattcatctacctgattcctgttctt
ttgatgggctacttacgtgttggttcaaggagagatgaagaatgagagtgctgcagcacagttggttgggtcagaatccgaggctg
cactaaagaatatcaaggccgaaaagcgacacacaaggctggtttcgtcatgatcctttctttcatcgtagcttggacccatataccttc
gtcgcctatgggtttcctttttcacgaaacaactgggccaatacctttatacgttgatactttggcagctatgcttcaaagtcgctggct
atgtcaaccatcatttactgcttctccacaagcaattcagaagagctgtattacgtggtgtttgtctgttccatccagagcagaacgt
gcagaagcggaaagcgcagcctcaagaagacctccacgatggcggcccccgccaagagcgagaactcagaggacccaagacagag
a
ccagccaagtggcgcctgccaagagcaggatcaccagcagggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaactgtaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 34

MGANITEILSGFLACVVFLSISLNMIVLITFYRLRHKLAFKDALMASMAFSDVVQAIVGY
PLEVFTVVDGKWF
GMELCQVAGFFITALGQVSIHLTALALDRYFTVCRPFVATAIHGSMRNAGMVIFVCWF
YASFWAVLPLVG
WSNYDVEGDGMRC SINWADDSPKSYSYRVCLFVFIYLIPVLLMVATYVVLVQGEMKNM
RGRAAQLFGSESE
AALKNIKAEKRHTRLVFMILSFIVAWTPYTFVAMWVSFFTKQLGPIPLYVDTLAAMLA
KSSAMFNPIIYCFL
HKQFRAVLRGVCLFHPEQNVQKRKRSLKKTSTMAAPPKSENSEDAK**KSRITSEGEYI**
PLDQIDINVTETSQV

APA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (М): JellyOP(palm)-5HT7

Конструирование: химерная молекула на основе опсина кубомедузы с С-концом мышинового 5-гидрокситриптаминового рецептора 7 (изоформы 1), добавленным за сайтом пальмитоилирования (Cys, выделенным серым цветом) JellyOP В данном случае была добавлена С-концевая последовательность рецептора 5-НТ7, начинающаяся за сайтом пальмитоилирования.

кДНК -- SEQ ID NO: 35

atgggagcgaatataacagaaatattgtcaggcttttagctgtgtagtatttctctataagcttgaatatgatagttctaattacattt
accgcttacgacataaattggcttttaagatgctctcatggctagatggcgttcagtgatgtgtacaagctatcgtaggatcccttag
aggattactgtagtagacggaaaatggacattcggaatggaattatgtcaagttgcaggattttcattactgccttggcaagttcc
atcgctcatctactgctctgccttagatcgatacttcacagtggtgcagaccttcgtggcaactgcgattcacggatcaatgagaaatgc
aggtaggtcatattgttgctggttctacgcgtcctctgggcagtctacccttagttggatggcaaatatgacgtggagggtgacgg
tatgcgatgctccatcaactggcagacgacagtcctaaaagctactacacagggtttgtttattcgtattcatctacctgattctgttctt
ttgatggctgacttacgtgttggtcaaggagatgaagaatatgcgaggtcgtgcagcacagttgttggtcagaatccgaggtcgt
cactaaagaatatcaaggccgaaaagcgacacacaaggctggttttcgtcatgatctttctttcatcgtagcttggacccatataccttc
gtcgccatgtgggtttctttttcacgaaacaactggccaatacctttatacgttgatactttggcagctatgcttgcгааagtcgtcggt
atgttaacccccatcatttactgcttctccacaagcaattcagaagagctgtattacgtggtgtttgtcagtagccggaatatcaaccggaa
gctctctgctgcaggcatgcacgaagccctgaaactgctgagaggcctgagagaagcagttgtgctacaaaactgtgaccactgtgg
gaaaaaaggctatgatacatgaaagagcaggatcaccagcggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgaca
g
agaccagccaagtggcgctgectaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 36

MGANITEILSGFLACVVFLSISLNMIVLITFYRLRHKLAFKDALMASMAFSDVVQAIVGY
PLEVFTVVDGKWF
GMELCQVAGFFITALGQVSIHLTALALDRYFTVCRPFVATAIHGSMRNAGMVIFVCWF
YASFWAVLPLVG
WSNYDVEGDGMRC SINWADDSPKSYSYRVCLFVFIYLIPVLLMVATYVVLVQGEMKNM
RGRAAQLFGSESE
AALKNIKAEKRHTRLVFMILSFIVAWTPYTFVAMWVSFFTKQLGPIPLYVDTLAAMLA
KSSAMFNPIIYCFL
HKQFRAVLRGVCQYRNINRKLSAAGMHEALKLAERPERSEFVLQNCDHCGKKGHDT
KSRITSEGEYIPLDQ
IDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=5HT7

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал экспорта из аппарата Гольджи**

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (N): PPO(palm)-mGluR6 (мышинный mGluR6)

Конструирование: Парапинопсин Lethenteron camtschaticum (PPO).

Сайт сплайсинга х в сайте пальмитоилирования PPO, слитого с СТ mGluR6 на две аминокислоты выше сайта HPE.

Последовательность ДНК -- SEQ ID NO: 37

Ccatggagaacttgacctcgctcgacctctgcccacggcgaggtcccgttgatgccccgctacggcttcaccatcctcgccgtgatcat
 ggccgtgttcaccatcgctcgctcgctcaacagcacccgtcgtcatcgccaccgcccagctacgccaccgctcaactct
 cgctcgtaacctcgccgtggcgacctggcggtcacgggttcggcgccagcctcgctggtggagaccaacgccgtcggtacttcaacc
 tcggccgctcggtcgctcatcgaagggttcgctgctttcttggcatcgccgctctgtgcacgatcgccgtgatcgccgtgatcg
 ttcgtggtggtgcaagccgctgggcacgctgatgttacgcggcgccacgcgctgctgggcatcgctggcctggctctggtcgttcg
 tgtggaacacgcccgcctcttcggctggggcagctacgagctggaggcgctgaggacgctgctgcgccccgactggtacagccgca
 с
 cccgccaacgtgtgtacattacgagctacttcgcttctgcttcgccatcccccttctcgtcatcggtggcgtaaggccgctcatgtgg
 accctccaccaggtggccaagctggggatggcgagagcggcagcaccgccaaggcggaggcgaggtgtcgcgcatggtggtgt
 с
 atggtggtggccttctcgtctgctggctgcctacgcgctcttcgccatgatcgtggtgaccaagcccgacgtgtacatcgaccggtcat
 cgccacactgccatgtacctgaccaagacgagcacggtctacaacccatcatctacatctcatgaaccgccagttccgggactcgcc
 cgtgcccttctgctctgctgttccatccagagcagaacctgcaagaagcggaaagcagcctcaagaagacctccacgatggcgccc
cgccccaaagagcagagaactcagaggacgccaagacagagaccagccaagtggcgctgccaagagcaggatcaccagcggggc
ga
gtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgtaa

Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 38

MENLTSLDLLPNGEVPLMPRYGFTILAVIMAVFTIASLVLNSTVVIVTLRHRQLRHPLNFS
 LVNLAVADL
 GVTVFGASLVVETNAVGYFNLGRVGCVIEGFVAFFGIAALCTIAVIAVDRFVVVCKPL
 GTLMFTRRHAL
 LGIAWAWLWSFVWNTPLFGWGSYELEGVRTSCAPDWYSRDPANVSYITSYFAFCFAIP
 FLVIVVAYGRL
 MWTLHQVAKLGMGESGSTAKAEAQVSRMVVVMVVAFLVCWLPYALFAMIVVTKPDV
 YIDPVIATLPMYL
 TKTSTVYNPIIYIFMNRQFRDCAVPFLCLFHPEQNVQKRKRSLSLKTSTMAAPPKSENSE
DAKKSRLTSEGEYI
PLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6

Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=необязательный сигнал экспорта
из аппарата Гольджи

Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Вариант осуществления (O): JSR1(palm)-mGluR6 (мышинный mGluR6)

Родопсин паука-скакуна, кумпопсин 1 из *Hasarius adansoni*

Конструирование: сайт сплайсинга х в сайте пальмитоилирования JSR1, слитого с СТ mGluR6 на две аминокислоты выше сайта HPE.

Последовательность кДНК -- SEQ ID NO: 39

atgttaccacatgcagcaaaaaatggcggccagggtggctggcgatcacgatggaagaacattcaattgttgatctctgccagaagac
atgtaccgatgattcacgaacattggataagttccccccgatggaaacttccatgcattatatcctcggaatgcttattataggtatagg
aatcatcagtgatcaggaatggagttgcatgtacttaatgatgacagtgaagaacctccgaactcccggtaattttctggattgaatc
ttgccctatctgattttggatgctgtttttatgatgccgacgatgtccataaattgcttcgccgaaacgtgggttataggaccttcatgtg
gagctctatggaatgatcggctcattatttggaaagtgcactctatctggagctggtaatgataaacactcgaccgatacaatgtcatcgtga
aaggaatggctggaaaaccttaacgaaagttggagcactgttaagaatgcttttcgctggatttggcattaggctggaccattgcacc
gatgtacggatggagcaggtatgttctgaaggctcgtgatcatcactattgactacatagatacagctattaatccaatgtcttac
cttatcgctacgctattttgtatactctgaccactctttatcattatttactgctacgctttcatcgtaatgcaagtagcagcccacgaga
aatccctacgagaacaagctaaaaagatgaacatcaaatccctcagatcaaatgaagataacaagaaagcaagtgagaattcagac
tggctaaggtggcttttatgaccatctgctgctggtcatggcgtggactccttataaccctgtccttcttggaaatcttctccgacaggac
ctggctaacacctatgacatccgfttggggagccatatttgcaaaagctagtgcctgctacaatcctattgtttatggaataagtcaccta
agtatcgtccgctttacatgataagttcccatgcctctgttccatccagagcagaacgtgcagaagcgggaagcgcagcctcaagaagac
ctccacgatggcggccccgccccaaagagcggagaactcagaggacgccaagacagagaccagccaagtggcgctgccaagagcag

ga**tcaccagcggggcgagtacatccccctggaccagatcgacatcaacgtgtaa****Пептидная последовательность -- SEQ ID NO: 40**

MLPAAKMAARVAGDHDGRNISIVDLLPEDMLPMIHEHWYKFPPMETSMHYILGMLII
VIGIISVSGNGV
VMYLMMTVKLNLRTPGNFLVLNLALSDFGMLFFMMPTMSINCFWVIGPFMCELYG
MIGSLFGSASIWS
LVMITLDRYNVIVKGMAGKPLTKVGALLRMLFVWIWSLWGTIAPMYGWSRYVPEGSM
TSCTIDYIDTAIN
PMSYLIAYAIFVYFVPLFIIYCYAFIVMQVAANEKSLREQAKKMNIKSLRSNEDNKKAS
AEFRLAKVAFMTICC
WFMAWTPYLTLFSLGIFSDRTWLTPMTSVWGAIFAKASACYNPIVYGISHPKYRAALH
DKFPCLFHPEQNV
QKRKRSLKKTSTMAAPPKSENSEDAKKSRTSEGEYIPLDQIDINVTETSQVAPA

Условные обозначения:

Выделено подчеркиванием=GRM6Выделено подчеркиванием и жирным шрифтом=**необязательный сигнал****экспорта из аппарата Гольджи**Выделено жирным шрифтом=**необязательный эпитоп 1D4**

Литературные источники

Ablonczy Z., Kono M., Knapp D. Crouch R., "Palmytolation of cone opsins" Vision Research 46 (2006) 4493-4501. doi: 10.1016/j.visres.2006.08.003

Ahn KH, Nishiyama A, Mierke DF, Kendall DA, "Hydrophobic residues in helix 8 of cannabinoid receptor 1 are critical for structural and functional properties". Biochemistry (2010) 49: 502-11

Bailes, H. and R. Lucas, "Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to

blue light ($\lambda_{\max} \approx 479$ nm) supporting activation of G(q/11) and G(i/o) signalling cascades". *Proc Biol Sci*, 2013. 280: p. 20122987. doi: 10.1098/rspb.2012.2987

Bruno A, Costantino G, De Fabritiis G, Pastor M, Selent J, "Membrane-Sensitive Conformational States of Helix 8 in Metabotropic Glu2 Receptor, a Class C GPCR". *PLoS ONE*, vol. 7, Issue 8, August 2012. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042023>)

Cronin T., Vandenberghe L., Hantz P., Juttner J., Reimann A., Kacsó Á., Huckfeldt R., Busskamp V., Kohler H., Lagali P., Botond R. & Bennett J. "Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter" *EMBO Mol Med*, 2014, 6(9): p. 1175-1190

Cehajic-Kapetanovic J., Eleftheriou C., Allen A.E., Milosavljevic N., Pienaar A., Bedford R., Davis K.E., Bishop P.N., Lucas R.J., "Restoration of Vision with Ectopic Expression of Human Rod Opsin". *Curr Biol*. 2015 Aug 17;25(16):2111-22. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.029. Epub 2015 Jul 30.

Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV, "In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous" *Sci Transl Med*. 2013 Jun 12;5(189):189ra76. doi: 10.1126/scitranslmed.3005708

David A., "Evolution of recombinant adeno-associated viral vectors for application in ocular gene therapy", диссертация в Бернском университете, 2018.

Davies W, Hankinsa M, Foster R., "Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors". 2010, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, 9, 1444-1457.

Fritze O, Slawomir F, Kuksa V, Palczewski K, Hofmann K, Ernst O., "Role of the conserved NPxxY(x)_{5,6}F motif in the rhodopsin ground state and during activation". *PNAS*, March 4, 2003, vol.100, No.5. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151333/>)

Gross A. K. et al., Defective Membrane Trafficking of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Mutant Ter349Glu Rhodopsin IS Rescued by C-Terminal Addition of 1D4 Epitope, *IOVS*, April 2009, Vol. 50, Issue 13

https://molbiol-tools.ca/Protein_tertiary_structure.htm, дата обращения 27 ноября 2020 г., 10:40

<https://www.schrodinger.com/prime>, дата обращения 27 ноября 2020 г., 10:45

Hulliger Carlos Elmar et al., Empowering Retinal Gene Therapy with a Specific Promoter of Human Rod and Cone ON-Bipolar Cells, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, Vol. 17, June 2020. pp. 505-519

Hulliger Carlos Elmar et al., Empowering Retinal Gene Therapy with a Specific Promoter of Human Rod and Cone ON-Bipolar Cells, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, Vol. 17, June 2020. pp. 505-519 - дополнительная информация

Hsu P., Lander E.S., Zhang F., "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering", *Cell* 157(6):1262-1278 (2014)

Kim D, Matsuda T and Cepko C. "A Core Paired-Type and POU Homeodomain-Containing Transcription Factor Program Drives Retinal Bipolar Cell Gene Expression", *J*

Neurosci 2008, 28: p. 7748-7764;

Kleinlogel S, "Optogenetic user's guide to Opto-GPCRs". *Frontiers in Bioscience, Landmark*, 21, 794-805, January 1, 2016.

Kuhlman, B., Bradley, P., "Advances in protein structure prediction and design". *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 681-697 (2019)

Lagali P.S., Balya D., Awatramani G.B., Münch T.A., Kim D.S., Busskamp V., Cepko C.L., Roska B, "Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration". *Nat Neurosci.* 2008 Jun;11(6):667-75. doi: 10.1038/nn.2117. Epub 2008 Apr 27.

Lin K., Simossis V.A., Taylor W.R., Heringa J., "A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks", *Bioinformatics* 21(2):152-159 (2005)

Lodowski et al., Signals Governing the Trafficking and Mistrafficking of a Ciliary GPCR, Rhodopsin, *The Journal of Neuroscience*, August 21, 2013, - 33(34):13621-13638.13621

Long C., Li H., Tiburcy M., Rodriguez-Caycedo C., Kyrychenko V., Zhou H., Zhang Y., Min Y., Shelton J.M., Mammen P.A., Liaw N.Y., Zimmermann W.H., Bassel-Duby R., Schneider J.W. and Olson E.N., "Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing", *Science Advances* 4(1) (2018) eaap9004, DOI: 10.1126/sciadv.aap9004

Lu Q, Ganjawala T, Ivanova E, Cheng J, Troilo D and Pan Z, "AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates", *Gene Ther*, 2016, 23: p. 680-9.

Moreira I S, "Structural features of the G-protein/GPCR interactions". *Biochimica et Biohysica Acta* Vol. 1840_1, p. 16-33, January 2014 (<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.027>)

Morri M, Sanchez-Romero I, Tichy AM, Kainrath S, Gerrard EJ, Hirschfeld PP, Schwarz J, Janovjak H "Optical functionalization of human Class A orphan G-protein-coupled receptors". *Nat Commun* 9: 1950 (2018),

doi:10.1038/s41467-018-04342-1 (2018).

Mure L, Hatori M, Zhu Q, Demas J, Kim I, Nayak S, Panda S, "Melanopsin-Encoded Response Properties of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells". 2016, *Neuron* 90, 1016-1027, June 1, 2016; <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.016>

Nygaard R et al. "The Dynamic Process of β -Adrenergic Receptor activation". *Cell* 152, 532-542, Jan 31, 2013. (<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.027>)

O'Brien, J.A., Lummis, S.C., "Nano-biologics: a method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles", *BMC Biotechnol* 11, 66 (2011). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-66>

Ovchinnikov Yu A, Abdulaev NG, Bogachuk AS, "Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitilated", <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.027>. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 1988; 230:1-5. [PubMed: 3350146]

Prusky G.T., Alam N.M., Beekman, S., Douglas R.M., "Rapid Quantification of Adult and Developing Mouse Spatial Vision Using a Virtual Optomotor System", 45:4611-4616, Dec. 2004

Santello M., Nevian T., "Dysfunction of Cortical Dendritic Integration in Neuropathic Pain Reversed by Serotonergic Neuromodulation", *Neuron* 86(1):233-246, March 26, 2015

Sato T., "Conserved 2nd Residue of Helix 8 of GPCR May Confer the Subclass-Characteristic and Distinct Roles through a Rapid Initial Interaction with Specific G Proteins", *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1752; doi:10.3390/ijms20071752.

Schiöth, H.B, Fredriksson R, "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective". *General and Comparative Endocrinology* 142, Feb. 15, 2005, 94-101. Doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018.

Schwartz T, Frimurer T, Holst B, Rosenkilde M and Elling C, "Molecular mechanism of 7TM receptor activation - a global toggle switch model". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 481-519 (2006- DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141218).

Siuda E, Copits B, Schmidt M, Baird M, Al-Hasani R, Planer W, Funderburk S, McCall J, Gereau IV R, Bruchas M, "Spatiotemporal control of opioid signaling and behavior". *Neuron*. 2015 May 20; 86(4): 923-935. doi:10.1016/j.neuron.2015.03.066

Somasundaram P, Wyrick GR, Fernandez DC, Ghahari A, Pinhal CM, Richardson MS, Rupp AC, Cui L, Wu Z, Brown RL, Badea TC, Hattar S, and Robinson PR., "C-terminal phosphorylation regulates the kinetics of a subset of melanopsin-mediated behaviors in mice". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Mar 7; 114(10): 2741-2746.

Sriram K and Insel P A, "G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs?". *Mol Pharmacol* 93:251-258, April 2018. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>

Tsai C-J, Pamula F, Nehmé R, Mühle J, Weinert T, Flock T, Nogly P, Edwards P, Carpenter B, Gruhl T, Ma P, Deupi X, Standfuss J, Tate C and Schertler G, "Crystal structure of rhodopsin in complex with a mini-Go sheds light on the principles of G protein selectivity", *Sci. Adv.* 2018; 4 : eaat 7052 19 September 2018

Tsai CJ, Marino J, Adaixo R, Pamula F, Muehle J, Maeda S, Flock T, Taylor NM, Mohammed I, Matile H, Dawson RJ, Deupi X, Stahlberg H, Schertler G, "Cryo-EM structure of the rhodopsin-G α i- β γ complex reveals binding of the rhodopsin C-terminal tail to the G β subunit". *Elife* 2019 Jun 28;8: e46041. Doi: 10.7554/eLife.46041

Vandemoortele, G., De Sutter, D. and Eyckerman, S., "Robust Generation of Knock-in Cell Lines Using CRISPR-Cas9 and rAAV-assisted Repair Template Delivery". *Bio-protocol* 7(7): e2211 (2017). DOI: 10.21769/BioProtoc.2211.

van Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Löwel S., Kleinlogel S., "Restoring the ON Switch in Blind Retinas: Chimeric opsin mGluR6 proteins, a Next-Generation, Cell-Tailored Optogenetic Tool". *PLoS Biol.* 2015 May 7;13(5):e1002143. doi: 10.1371/journal.pbio.1002143. eCollection 2015 May.

Zhu X, Brown B, Li A, Mears AJ, Swaroop A, Craft CM, "GRK1-dependent

phosphorylation of S and M opsins and their binding to cone arrestin during cone phototransduction in the mouse retina". J Neurosci. 2003 Jul 9, 23(14):6152-60.

Хотя выше были показаны и описаны предпочтительные в настоящее время варианты осуществления настоящего изобретения, следует четко понимать, что настоящее изобретение не ограничено ими, но может быть иным образом по-разному воплощено и осуществлено на практике в пределах объема нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий семь трансмембранных доменов (TM1-TM7), соединенных вне- и внутриклеточными петлями (EL и IL),

где указанный химерный белок на основе опсина и GPCR содержит светочувствительную опсиновую часть из вышерасположенного опсина,

где указанная часть из вышерасположенного опсина содержит хромофорный карман, ковалентно связывающий хромофор,

где указанный химерный белок на основе опсина и GPCR содержит вторую GPCR-часть (целевую GPCR-часть) из второго белка GPCR (целевого белка GPCR),

где указанная целевая GPCR-часть содержит С-концевой домен (СТ целевого GPCR);

характеризующийся тем, что

указанная часть из вышерасположенного опсина дополнительно содержит усеченный С-концевой домен (усеченный СТ опсина) с сайтом усечения, расположенным на дистальном конце проксимальной области СТ вышерасположенного опсина (проксимальной области О-СТ) или ниже него,

где указанная проксимальная область О-СТ содержит мотив NR(K)Q и следующие за ним 7-13 аминокислот в дистальном направлении,

при этом указанный химерный белок на основе опсина и GPCR содержит химерный С-концевой домен (химерный СТ); и

где указанный СТ целевого GPCR расположен ниже указанного усеченного СТ опсина.

2. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 1, где дистальный конец проксимальной области О-СТ расположен в положении, выбранном из группы, включающей:

- положение на дистальном конце спирали 8 (H8),
- положение в сайте пальмитоилирования или
- положение, соответствующее сайту пальмитоилирования в бычьем родопсине.

3. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, содержащий сайт усечения в СТ вышерасположенного опсина на дистальном конце дистального удлинения проксимальной области О-СТ,

где дистальное удлинение проксимальной области О-СТ содержит до 5, или до 10, или до 16, или до 22, или до 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот ниже дистального конца проксимальной области О-СТ или, в частности, ниже сайта пальмитоилирования.

4. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 3, где вышерасположенный опсин выбран из группы меланопсинов.

5. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 3, где вышерасположенный опсин выбран из группы опсинов, содержащих СТ длиной по меньшей мере 50, 65, 80, 100, 150 или 200 аминокислот.

6. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина содержит весь вышерасположенный опсин вплоть до сайта усечения, или

где часть из вышерасположенного опсина содержит непрерывную область вышерасположенного опсина от мотива E(DRY) вплоть до сайта усечения, или

где часть из вышерасположенного опсина содержит TM3, TM4, TM5, TM6 и TM7 и необязательно усеченный СТ опсина вплоть до сайта усечения.

7. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина содержит трансмембранные домены TM3 и TM7, в частности содержит трансмембранные домены TM3-TM7, TM2-TM7 или TM1-TM7.

8. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина содержит один или несколько внеклеточных доменов, выбранных из EL1, EL2, EL3 и NT.

9. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина получена из двух или более исходных опсинов, в частности из двух исходных опсинов.

10. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина содержит трансмембранные домены, полученные из исходного опсина, который является опсином, отличным от человеческого, и

где часть из вышерасположенного опсина дополнительно содержит один, или два, или три, или все внеклеточные домены, полученные из исходного опсина, который является человеческим опсином.

11. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где TM7 и усеченный СТ опсина получены из одного и того же исходного опсина.

12. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина содержит все внеклеточные домены, все трансмембранные домены и все внутриклеточные петли.

13. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина содержит весь исходный вышерасположенный опсин вплоть до сайта усечения в СТ вышерасположенного опсина.

14. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина получена из моностабильного или бистабильного опсина или из тристабильного опсина, в частности из бистабильного опсина.

15. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина получена из исходного опсина, выбранного из группы опсинов, включающей:

- меланопсин (OPN4);

- родопсин (RHO);
- опсины колбочек (OPN1SW, OPN1LW и OPN1MW);
- опсин медузы (CubOP, JellyOP);
- родопсин паука-скакуна (JSR1);
- парапинопсин (PPO);
- нейропсин (OPN5);
- энцефалопсин (OPN3).

16. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, содержащий целевой СТ, который представляет собой функциональный вариант СТ исходного целевого GPCR, характеризующийся, в частности, делецией одной или нескольких аминокислот, в частности N-концевой делецией, между мотивом NPxxY и любым аминокислотным положением вплоть до сайта пальмитоилирования или вплоть до аминокислотного положения, смежного с проксимальной стороны с сайтом пальмитоилирования.

17. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 1, где целевая GPCR-часть получена из отличного от опсинового GPCR или получена из второго опсина, называемого целевым опсином.

18. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где целевая СТ-часть получена из исходного целевого GPCR, выбранного из группы белков GPCR, включающей:

GPCR класса А, в частности выбранные из группы, включающей:

- опсины колбочек, в частности OPN1SW, OPN1MW или OPN1LW,
- серотониновые рецепторы, в частности 5-HT7,
- мю-опиоидный рецептор,
- β -адренергический рецептор, в частности бета-1-адренорецептор, бета-2-адренорецептор и бета-3-адренорецептор;

GPCR класса В, в частности выбранные из группы, включающей:

- рецепторы гормонов, в частности *рецептор глюкагона* (GCGR);

GPCR класса С, в частности выбранные из группы, включающей:

- рецепторы GABA_B, в частности GABA_{B1} и GABA_{B2};
- метаботропные глутаматные рецепторы, в частности рецепторы mGluR6 и mGluR5.

19. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где целевой GPCR представляет собой GPCR класса А, или GPCR класса В, или GPCR из другого класса GPCR, за исключением GPCR класса С, и где целевая GPCR-часть необязательно содержит одну или несколько внутриклеточных петель, выбранных из IL1, IL2 и IL3.

20. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где целевой белок GPCR представляет собой GPCR класса С, в частности mGluR6, и где целевая GPCR-часть класса С необязательно содержит одну или несколько

внутриклеточных петель, выбранных из IL1, IL2 и IL3, при условии, что удовлетворяется один из следующих критериев:

А: в химерном GPCR исключено одновременное присутствие IL3 природного размера, содержащейся в части из вышерасположенного опсина, и IL2 природного размера из GPCR класса С в положениях, соответствующих их нативному положению;

В: часть из вышерасположенного опсина содержит все внутриклеточные петли IL1-IL3;

С: часть из вышерасположенного опсина содержит IL1, а целевая GPCR-часть содержит как IL2, так и IL3, которые замещают IL2 и IL3 вышерасположенного опсина в соответствующих положениях.

21. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где СТ химерного белка на основе опсина и GPCR дополнительно содержит один или несколько элементов последовательности, выбранных из следующей группы элементов:

- сигнала экспорта из аппарата Гольджи;
- последовательности для мембранной транспортировки;
- элемента последовательности, кодирующего флуоресцентный белок,

и где один или несколько выбранных элементов расположены независимо в любом порядке на С-конце СТ химерного белка на основе опсина и GPCR.

22. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где СТ химерного белка на основе опсина и GPCR содержит в качестве выбранного элемента сигнал экспорта, в частности сигнал экспорта из эндоплазматического ретикулума, более конкретно сигнал экспорта из эндоплазматического ретикулума Kir2.1, содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 86 или состоящий из нее, или, в частности, сигнал экспорта из аппарата Гольджи, более конкретно сигнал экспорта из аппарата Гольджи калиевого канала Kir2.1, содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 85 или состоящий из нее.

23. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где СТ химерного белка на основе опсина и GPCR содержит в качестве выбранного элемента последовательности последовательность для мембранной транспортировки, в частности из опсина, более конкретно из родопсина, наиболее конкретно содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 87 или состоящую из нее.

24. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где СТ химерного белка на основе опсина и GPCR содержит выбранный элемент последовательности, кодирующий флуоресцентный белок, в частности mKate2, TurboFP635 или mScarlet,

где флуоресцентный белок непосредственно слит с СТ химерного белка на основе опсина и GPCR либо связан посредством последовательности IRES или T2A.

25. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где целевая GPCR-часть дополнительно содержит IL1, и где IL1 целевого GPCR замещает IL1 вышерасположенного опсина.

26. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где IL3 вышерасположенного опсина замещена IL3 целевого GPCR ;

или

где IL3 вышерасположенного опсина замещена химерной IL3, где IL3 целевого GPCR замещает переменную область в IL3 опсина.

27. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, в частности, где целевой GPCR представляет собой mGluR6, где целевой СТ содержит проксимальный конец в мотиве NR(K)Q или выше него.

28. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где целевой GPCR представляет собой mGluR6, и где IL3 mGluR6 частично замещает переменную область IL3 опсина, за счет чего образуется химерная IL3.

29. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где целевой GPCR представляет собой mGluR6, и

где часть из вышерасположенного опсина дополнительно содержит одну или несколько внутриклеточных петель, выбранных из IL1, IL2 и IL3,

при условии, что в химерном белке на основе вышерасположенного опсина и mGluR6 исключено одновременное присутствие IL3 природного размера, содержащейся в части из вышерасположенного опсина, и IL2 природного размера, содержащейся в mGluR6-части.

30. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов, где часть из вышерасположенного опсина получена из меланопсина и содержит NT, EL1-EL3, TM1-TM7, IL1 и усеченный СТ опсина, и где целевая GPCR-часть получена из mGluR6 и содержит IL2, IL3 и СТ, или где целевая GPCR-часть получена из hOPN1mw и содержит IL2, IL3 и СТ.

31. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44.

32. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 31, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28, или состоящий из нее.

33. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 35, где аминокислотная последовательность представляет собой вариант любой из указанных последовательностей, содержащий одно или несколько видоизменений, выбранных из:

- консервативной аминокислотной замены,
- делеции в диапазоне от 1 до 3, 5, 8 или 15 аминокислот,
- вставки в диапазоне от 1 до 3, 5, 8 или 15 аминокислот, и

где химерный белок на основе опсина и GPCR демонстрирует зависимое от световой активации связывание белка G-альфа, специфичного к целевому GPCR.

34. Химерный белок на основе опсина и GPCR по п. 35 или п. 36, где аминокислотная последовательность представляет собой вариант любой из этих последовательностей, характеризующийся по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью.

35. Пептид, содержащий химерный С-концевой домен (химерный СТ), полученный из СТ исходного опсина и СТ исходного целевого GPCR, в частности содержащий химерный С-концевой домен (химерный СТ) химерного белка на основе опсина и GPCR по любому из предыдущих пунктов,

где указанный пептид содержит усеченный С-концевой домен опсина (усеченный СТ опсина), содержащий проксимальную область СТ, в частности, содержащую спираль 8 (Н8) и сайт пальмитоилирования, соответствующий С322 или С323 соответственно бычьего родопсина, и необязательно дополнительно содержащую до 33, 34 или 35 аминокислот ниже сайта пальмитоилирования опсина,

где указанный пептид дополнительно содержит С-концевой домен целевого GPCR (СТ целевого GPCR) или его функциональный вариант, в частности функциональный фрагмент, где СТ целевого GPCR расположен ниже усеченного СТ опсина.

36. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный белок на основе опсина и GPCR или пептид по любому из предыдущих пунктов.

37. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 36, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 98% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44.

38. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 36, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 70%, или 80%, или 90% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43.

39. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 36, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:

19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или состоящая из нее.

40. Капсидный полипептид AAV для применения в медицинской терапии для доставки молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 35-39 в клетку-мишень.

41. Капсидный полипептид AAV для применения по п. 40, где капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV2, AAV2(7m8) или AAV8(BP2).

42. Капсидный полипептид AAV для применения по п. 41, где капсидный полипептид представляет собой капсидный полипептид AAV2 и содержит аминокислотную вставку между аминокислотами 587 и 588 в AAV2 дикого типа,

где пептидная вставка содержит последовательность, выбранную из группы пептидных последовательностей, включающей:

- SASEAST (SEQ ID NO: 60),
- TPPSITA (SEQ ID NO: 61),
- P RTPHTA (SEQ ID NO: 62),
- NHAPNHC (SEQ ID NO: 63), или состоит из нее.

43. Капсидный полипептид AAV для применения по п. 41 или п. 42, где капсид AAV2 содержит полипептид из 7-13 аминокислот, где, в частности, пептидная вставка содержит пептидную вставку по п. 42 и дополнительно содержит один или два фланкирующих линкера,

где линкеры содержат до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот с каждой из сторон при условии, что общее количество аминокислот в линкерах не превышает 6 аминокислот,

где, в частности, линкеры содержат 2 или 3 аминокислоты с каждой из сторон, и где линкеры содержат аминокислоты, выбранные из i. аминокислот G и A или ii. аминокислот A, N, L, T, R, G, A, N, L и R, в частности из A, L, N, R, или состоят из них, где более конкретно по меньшей мере одна из аминокислот выбрана из N и R.

44. Капсидный полипептид AAV для применения по п. 43, содержащий пептидную вставку между N587 и R588 в AAV2 дикого типа, выбранную из:

- AAASASEASTAA (SEQ ID NO: 64),
- AAATPPSITAAA (SEQ ID NO: 65),
- AAAP RTPHTAAA (SEQ ID NO: 66),
- NLANHAPNHCAR (SEQ ID NO: 67),
- NLAP RTPHTAAR (SEQ ID NO: 68).

45. Капсидный полипептид аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий пептидную вставку в положении между 587 и 592 в AAV серотипа 2 дикого типа (AAV2), в частности между N587 и R588 в AAV серотипа 2 или в положении, гомологичном ему в AAV другого серотипа, где пептидная вставка выбрана из группы последовательностей, включающей:

- NLANHAPNHCAR (SEQ ID NO: 67),
- NLAP RTPHTAAR (SEQ ID NO: 68).

46. Капсидный полипептид AAV для применения по любому из пп. 40-44 или капсид AAV по п. 45,

где капсид содержит одну или несколько мутаций, выбранных из:

а. замены тирозина (Y) на фенилаланин (F) в аминокислотном положении 252, 272, 444, 500, 700, 704 и/или 730; и/или

б. замены треонина (T) на валин (V) в аминокислотном положении 491.

47. Капсидный полипептид AAV для применения по п. 42 или капсид AAV по п. 45 или по п. 45 и п. 46,

в частности, содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 74 или состоящий из нее.

48. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая капсид AAV по любому из пп. 40-47.

49. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 48, где молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный полипептид, выбранный из AAV2, AAV2(7m8), или AAV8(BP2), или AAV2(NHAPNHC), или AAV2(PRTPHTA), или состоит из нее.

50. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 48 или п. 49, где молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность с пептидной вставкой между N587 и R588 в геноме AAV2, выбранной из:

- AAASASEASTAA (SEQ ID NO: 64),

- AAATPPSITAAA (SEQ ID NO: 65),

- AAAPRTPHTAAA (SEQ ID NO: 66),

- NLANHAPNHCAR (SEQ ID NO: 67),

- NLAPRTPHTAAR (SEQ ID NO: 68), или состоит из нее.

51. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-50, где молекула нуклеиновой кислоты содержит трансген,

где, в частности, трансген кодирует химерный белок на основе опсина и GPCR и, в частности, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43, или состоит из нее.

52. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-51, где молекула нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий химерный GPCR *mela(palm)-mGluR6*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или состоящий из нее.

53. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 51 или п. 52, содержащая

клеточноспецифический промотор,

где клеточноспецифический промотор функционально связан с трансгеном,

где клеточноспецифический промотор представляет собой, в частности, промотор, специфичный для ON-биполярных клеток, более конкретно выбранный из группы, включающей промотор 200En-mGluR500P, промотор 770En_454P(hGRM6) согласно SEQ ID NO: 75, или промотор 444En_454P(hGRM6) согласно SEQ ID NO: 76, или эндогенный промотор mGluR6 ON-биполярных клеток сетчатки, или их элементы.

54. Вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV), содержащий последовательность, кодирующую капсид AAV по п. 45, или по п. 45 и п. 46, или по п. 45 и п. 47.

55. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 36-39, в частности вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий трансген, кодирующий химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 36-39, функционально связанный с промотором.

56. Вектор по п. 54 или п. 55, где вектор представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV).

57. Вектор по любому из пп. 54-56, выбранный из группы серотипов AAV, включающей AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV12, в частности AAV2 или AAV8.

58. Вектор по любому из пп. 54-57, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы последовательностей, включающей:

- последовательность, кодирующую капсидный белок AAV, и/или
- промотор, в частности клеточноспецифический промотор, более конкретно промотор, специфичный для биполярных клеток.

59. Вектор по любому из пп. 54-58, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 35-39, которая находится под управлением промотора, специфичного для ON-биполярных клеток, выбранного, в частности, из группы промоторов, включающей:

- промотор GRM6-sv40,
- промотор 4xGRM6-sv40,
- промотор 200En-mGluR500P,
- промотор 770En_454P(hGRM6) под SEQ ID NO: 75,
- промотор 444En_454P(hGRM6) под SEQ ID NO: 76 и
- эндогенный промотор mGluR6 ON-биполярных клеток сетчатки или их элементы.

60. Вектор по любому из пп. 54-59, содержащий трансген, кодирующий химерный белок на основе меланопсина и mGluR6 (Mela-mGluR6), в частности Mela(palm)-mGluR6 или Mela(palm+33)-mGluR6, или химерный OPN1mw-mGluR6, или химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий два опсина.

61. Вектор по пп. 54-60, содержащий трансген, где трансген кодирует химерный

Mela-mGluR6, выбранный из группы, включающей:

- Mela(palm)-mGluR6, в частности в соответствии с одной из последовательностей, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или

- Mela(palm+33)-mGluR6, в частности согласно SEQ ID NO: 15, или

- Mela-mGluR6, дополнительно содержащий внутриклеточную петлю, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31.

62. Вектор по любому из пп. 54-61,

где вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид AAV по любому из пп. 40-47, в частности по любому из пп. 43-47.

63. Вектор по комбинации пп. 54-62,

где вектор содержит промотор 770Ep-445P(hGRM6), функционально связанный с трансгеном, кодирующим химерный белок на основе опсина и GPCR, и

где вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид, выбранный из группы, включающей AAV2(7m8), AAV8(BP2), AAV2(NHAPNHC) и AAV2(PRTPHTA),

где, в частности, трансген кодирует химерный белок на основе опсина и GPCR, выбранный из группы, включающей:

- химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий меланопсин или hOPN1mw в качестве вышерасположенного опсина и mGluR6 в качестве целевого опсина, или химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий два опсина,

- химерный белок на основе опсина и GPCR, выбранный из Mela(palm)-mGluR6 или Mela(palm+33)-mGluR6,

- химерный белок на основе опсина и GPCR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31.

64. Вектор по п. 54 или п. 55, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты с последовательностью согласно SEQ ID NO: 79 или состоящий из нее.

65. Трансгенное животное, в частности трансгенная мышь, или трансгенная клетка, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 36-39, или содержащие вектор по любому из пп. 54-64, и/или содержащие белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35.

66. Трансгенная клетка по п. 60, где клетка получена из линии стволовых клеток, в частности за исключением линий зародышевых клеток, или где клетка получена из органотипической линии клеток, в частности выбранной из группы линий клеток, включающей:

- клетки HEK293-GIRK,

- нейроны внутренних слоев сетчатки, в частности ON-биполярные клетки,

- клетки почки и

- клетки, экспрессирующие G-белок, выбранный из Gs, Gq или G_{12/13}.

67. Трансгенное животное или трансгенная клетка по п. 65 или п. 66, содержащие геном, модифицированный посредством CRISPR/Cas.

68. Носитель, содержащий:

химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35, или

молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 36-39, или вектор по любому из пп. 54-64,

где молекула нуклеиновой кислоты или вектор содержат трансген, кодирующий химерный белок на основе опсина и GPCR,

где носитель подходит для переноса указанного химерного белка на основе опсина и GPCR в клетку-мишень, или человека, или животное, отличное от человека, и

где носитель необязательно выбран из группы, включающей везикулу, частицу, микрочастицу, наночастицу и частицу золота.

69. Носитель для переноса по п. 68, где носитель содержит трансген и кассету CRISPR/Cas.

70. Трансгенное животное или трансгенная клетка по любому из пп. 65-67 или носитель для переноса по любому из пп. 68-69, содержащие трансген, кодирующий химерный белок на основе меланоопсина и mGluR6 (Mela-mGluR6), в частности Mela(palm)-mGluR6 или Mela(palm+33)-mGluR6, или химерный OPN1mw-mGluR6, или химерный белок на основе опсина и GPCR, содержащий два опсина.

71. Трансгенное животное или трансгенная клетка по любому из пп. 65-67 или носитель для переноса по любому из п. 68 или п. 69,

где трансген кодирует химерный Mela-mGluR6, выбранный из группы, включающей:

- Mela(palm)-mGluR6, в частности в соответствии с одной из последовательностей, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или

- Mela(palm+33)-mGluR6, в частности согласно SEQ ID NO: 15, или

- Mela-mGluR6, дополнительно содержащий внутриклеточную петлю, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31.

72. Способ получения посредством генной инженерии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок на основе опсина и GPCR или химерный пептид, в частности по любому из пп. 1-35,

где указанный химерный белок на основе опсина и GPCR или указанный химерный пептид содержит химерный С-концевой домен (химерный СТ), содержащий усеченный СТ вышерасположенного опсина,

где указанный химерный СТ получен из СТ исходного вышерасположенного опсина и из СТ исходного целевого GPCR, и

где указанный способ включает стадии:

A-1 выбора сайта усечения (x) в СТ исходного вышерасположенного опсина в

аминокислотном положении на дистальном конце проксимальной области О-СТ или в пределах дистального удлинения проксимальной области О-СТ,

А-2 получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей часть из вышерасположенного опсина или пептид с усеченным СТ, который усечен по выбранному сайту усечения;

В-1 выбора сайта разрезания (у) в пределах проксимальной области СТ исходного целевого GPCR, в частности в мотиве NR(K)Q или выше него или между мотивами NRxxY и NR(K)Q,

В-2 получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей СТ целевого GPCR или его функциональный вариант, в частности его функциональный фрагмент; и

С-1 слияния молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный СТ опсина, полученной на стадии А-2, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой СТ или его функциональный вариант, полученной на стадии В-2.

73. Способ получения посредством генной инженерии по п. 72,

где на стадии А-1 сайт усечения (х) удовлетворяет одному или нескольким критериям, выбранным из группы критериев, включающей следующее:

- сайт усечения (х) расположен в нуклеотиде, расположенном в мотиве NR(K)Q или на по меньшей мере 7, или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13 аминокислот ниже него,

- сайт усечения (х) расположен ниже сайта пальмитоилирования или аминокислоты, соответствующей сайту пальмитоилирования, и в частности является смежным с ними с дистальной стороны,

- сайт усечения расположен на расстоянии до не более 45, или 47, или 49 нуклеотидов ниже мотива NR(K)Q.

74. Способ получения посредством генной инженерии по п. 72, где, в частности, вышерасположенный опсин представляет собой меланопсин, и

где на стадии А-1 сайт усечения (х) удовлетворяет одному или нескольким критериям, выбранным из группы критериев, включающей следующее:

- сайт усечения (х) расположен на расстоянии до 30, или 31, или 32, или 33, или 34, или 35 аминокислот ниже проксимальной области О-СТ, в частности на дистальном конце дистального удлинения проксимальной области О-СТ,

- сайт усечения (х) расположен на расстоянии до 45, или 47, или 49 нуклеотидов ниже мотива NR(K)Q,

- сайт усечения расположен в аминокислотном положении ниже консервативного кластера сайтов фосфорилирования и, в частности, является смежным с дистальной стороны с дистальным концом указанного кластера консервативных сайтов фосфорилирования.

75. Способ получения посредством генной инженерии по п. 72, где как сайт усечения х в вышерасположенном опсине, выбранный на стадии А-1, так и сайт разрезания у в целевом GPCR, выбранный на стадии В-1, расположены в их

соответствующих сайтах пальмитоилирования или в аминокислотном положении, соответствующем сайту пальмитоилирования, либо оба они расположены на 7-13, в частности 8-12, более конкретно 9-11 или приблизительно 10 аминокислот ниже сайта NR(K)Q.

76. Способ получения посредством генной инженерии по любому из пп. 72-75, включающий одну или несколько дополнительных стадий замещения или частичного замещения одной или нескольких внутриклеточных петель, в частности замену в соответствующих положениях одной или нескольких внутриклеточных петель или части внутриклеточной петли вышерасположенного опсина на внутриклеточную петлю целевого GPCR,

где, в частности, один или несколько сайтов сплайсинга выбраны из группы, включающей:

- участок соединения a и участок соединения b для замены IL1,
- участок соединения c и участок соединения d для замены IL2,
- участок соединения e и участок соединения f для замены IL3,
- два сайта сплайсинга в IL3, в которых происходит удаление высоковариабельной области IL3 вышерасположенного опсина с заменой на IL3 целевого GPCR.

77. Способ получения посредством генной инженерии по любому из пп. 72-76, дополнительно включающий перед стадией A и/или стадией B идентификацию консервативных мотивов в одной или обеих из последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих исходные GPCR, включающую стадии:

- выравнивания аминокислотной последовательности опсина или его фрагмента с аминокислотной последовательностью целевого GPCR или его фрагмента, необязательно с помощью инструмента для выравнивания последовательностей,

- определения аминокислотных положений, составляющих консервативный мотив, выбранный из группы консервативных мотивов, включающей, в частности:

- E(D)RY/NRI,
- E вблизи участка соединения IL3 с TM6,
- NPxxY,
- NR(K)Q,
- пальмитоилированный C и
- K для связывания хромофора в TM7, при условии, что целевой GPCR также представляет собой опсин;

где аминокислотную последовательность вышерасположенного опсина необязательно выравнивают с аминокислотной последовательностью бычьего родопсина для идентификации аминокислотных положений, составляющих консервативный мотив.

78. Способ получения посредством генной инженерии по любому из пп. 72-77, дополнительно включающий перед стадией A и/или стадией B идентификацию консервативных 3D-доменов или субдоменов GPCR, в частности субдомена, представляющего собой спираль 8, в одном или обоих из исходного опсина и исходного

целевого GPCR, включающую стадию ввода данных о первичной аминокислотной последовательности в программу для предсказания вторичной/третичной структуры белка.

79. Химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный белок на основе опсина и GPCR, по любому из пп. 36-39, или капсид по любому из пп. 40-47, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный капсид, по пп. 48-53, или вектор по любому из пп. 54-64, или носитель или клетка по любому из пп. 65-71, для медицинского применения, в частности для генной терапии.

80. Химерный белок на основе опсина и GPCR, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный белок на основе опсина и GPCR, или капсид, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный капсид, или вектор, или носитель, или клетка, для применения по п. 79, где цель применения выбрана из группы, включающей улучшение зрения, лечение частичной или полной слепоты, лечение пигментного ретинита (RP), лечение дегенерации желтого пятна и лечение других форм дегенерации фоторецепторов.

81. Химерный белок на основе опсина и GPCR, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный белок на основе опсина и GPCR, или капсид, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный капсид, или вектор, или носитель, или клетка, для применения по п. 79 или п. 80, где химерный белок на основе опсина и GPCR выбран из химерного белка на основе опсина и GPCR mGluR6 или химерного GPCR, содержащего вышерасположенный опсин и целевой опсин, где, в частности, целевой опсин представляет собой опсин колбочек или родопсин.

82. Фармацевтическая композиция, содержащая продукт, выбранный из группы продуктов, включающей:

химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный белок на основе опсина и GPCR, по любому из пп. 36-39, или капсид по любому из пп. 40-47, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный капсид, по пп. 48-53, или вектор по любому из пп. 54-64, или носитель или клетку по любому из пп. 65-71, где химерный белок на основе опсина и GPCR необязательно выбран из химерного

белка на основе опсина и GPCR mGluR6 или химерного GPCR, содержащего вышерасположенный опсин и целевой опсин, и

где целевой опсин необязательно представляет собой опсин колбочек или родопсин.

83. Способ лечения нуждающегося в этом человека или животного, отличного от человека, включающий введение:

химерного белка на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35,
или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный белок на основе опсина и GPCR, по любому из пп. 36-39,

или капсида по любому из пп. 40-47,

или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный капсид, по пп. 48-53,

или вектора по любому из пп. 54-64,

или носителя или клетки по любому из пп. 65-71,

где химерный белок на основе опсина и GPCR необязательно выбран из химерного белка на основе опсина и GPCR mGluR6 или химерного GPCR, содержащего вышерасположенный опсин и целевой опсин, и

где целевой опсин необязательно представляет собой опсин колбочек или родопсин.

84. Применение

химерного белка на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35,
или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный белок на основе опсина и GPCR, по любому из пп. 36-39,

или капсида по любому из пп. 40-47,

или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный капсид, по пп. 48-53,

или вектора по любому из пп. 54-64,

или носителя или клетки по любому из пп. 65-71,

при изготовлении лекарственного препарата для медицинской терапии для улучшения зрения, или для лечения частичной или полной слепоты, или для лечения пигментного ретинита (RP), или для лечения дегенерации желтого пятна, или для лечения других форм дегенерации фоторецепторов,

где химерный белок на основе опсина и GPCR необязательно выбран из химерного белка на основе опсина и GPCR mGluR6 или химерного GPCR, содержащего вышерасположенный опсин и целевой опсин, и

где целевой опсин необязательно представляет собой опсин колбочек или родопсин.

85. Медицинское применение по любому из пп. 79-84, предусматривающее продукт, выбранный из группы продуктов, включающей:

химерный белок на основе опсина и GPCR по любому из пп. 1-35,

или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный белок на основе опсина и GPCR, по любому из пп. 36-39,

или капсид по любому из пп. 40-47,

или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный капсид, по пп. 48-53,

или вектор по любому из пп. 54-64,

или носитель или клетку по любому из пп. 65-71,

где продукт содержит химерный белок на основе опсина и GPCR или содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный химерный белок на основе опсина и GPCR,

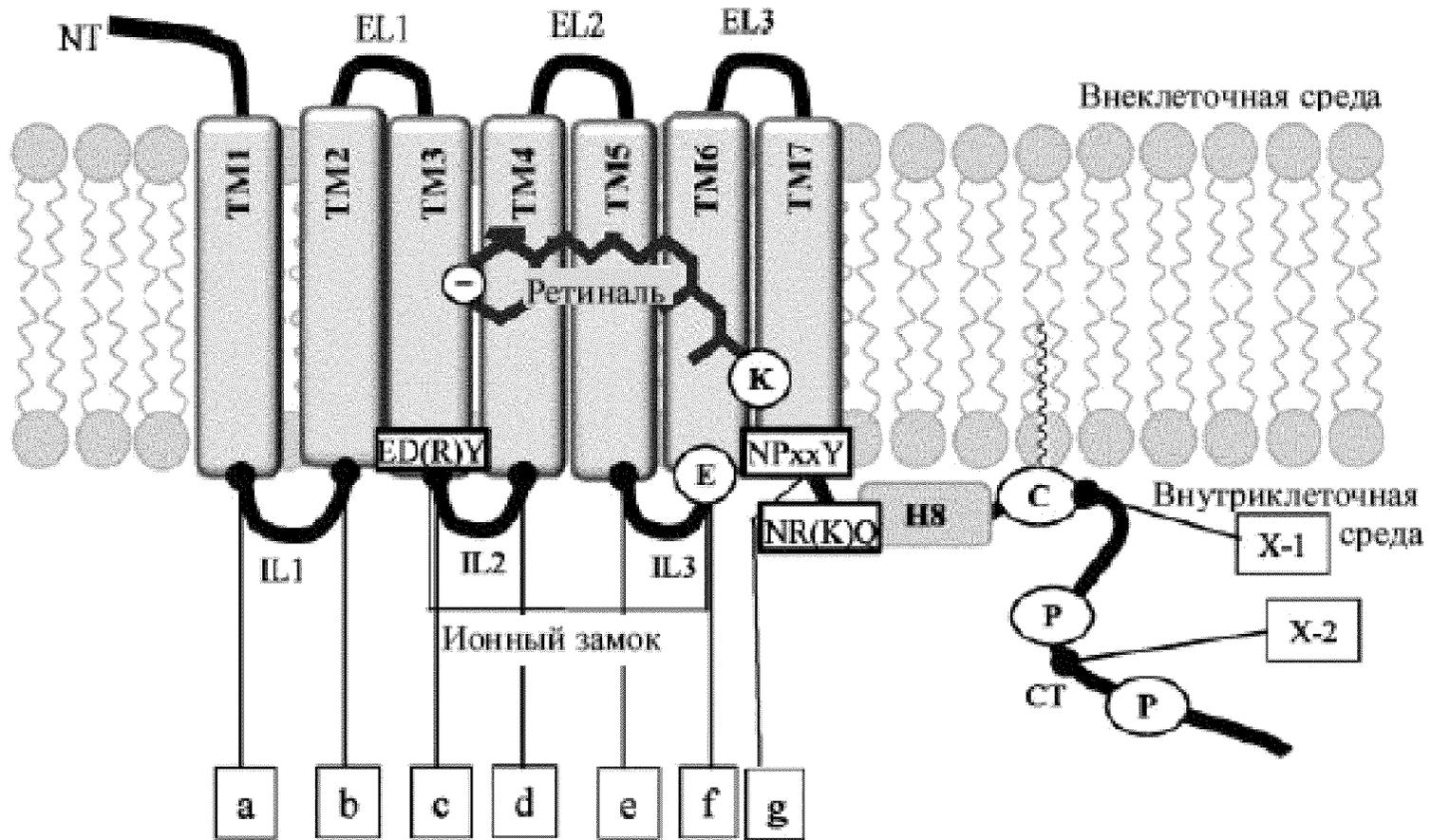
где химерный белок на основе опсина и GPCR выбран из группы, включающей:

- Mela(palm)-mGluR6, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28, или

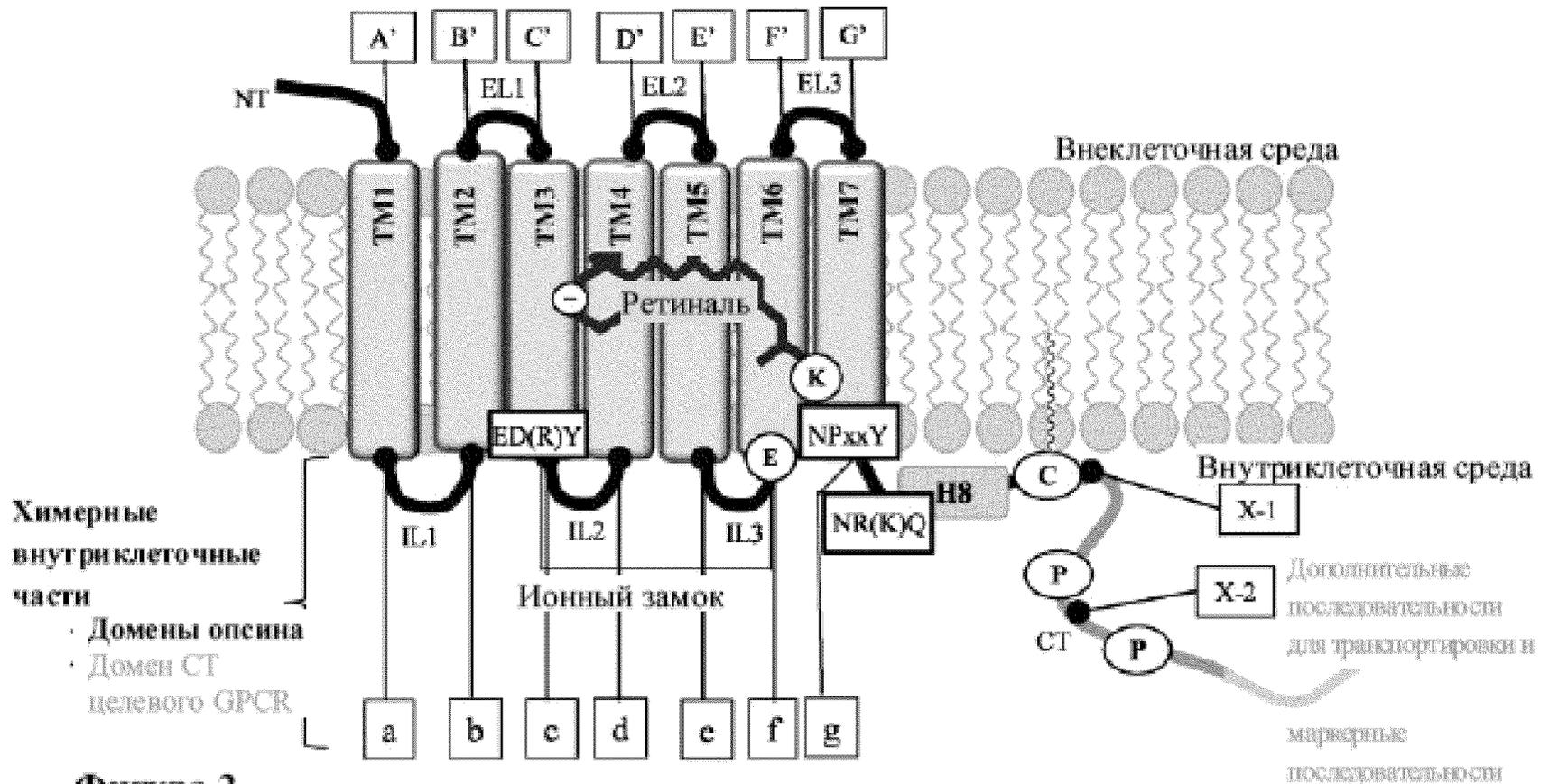
- Mela(palm+33)-mGluR6, в частности согласно SEQ ID NO: 16, или

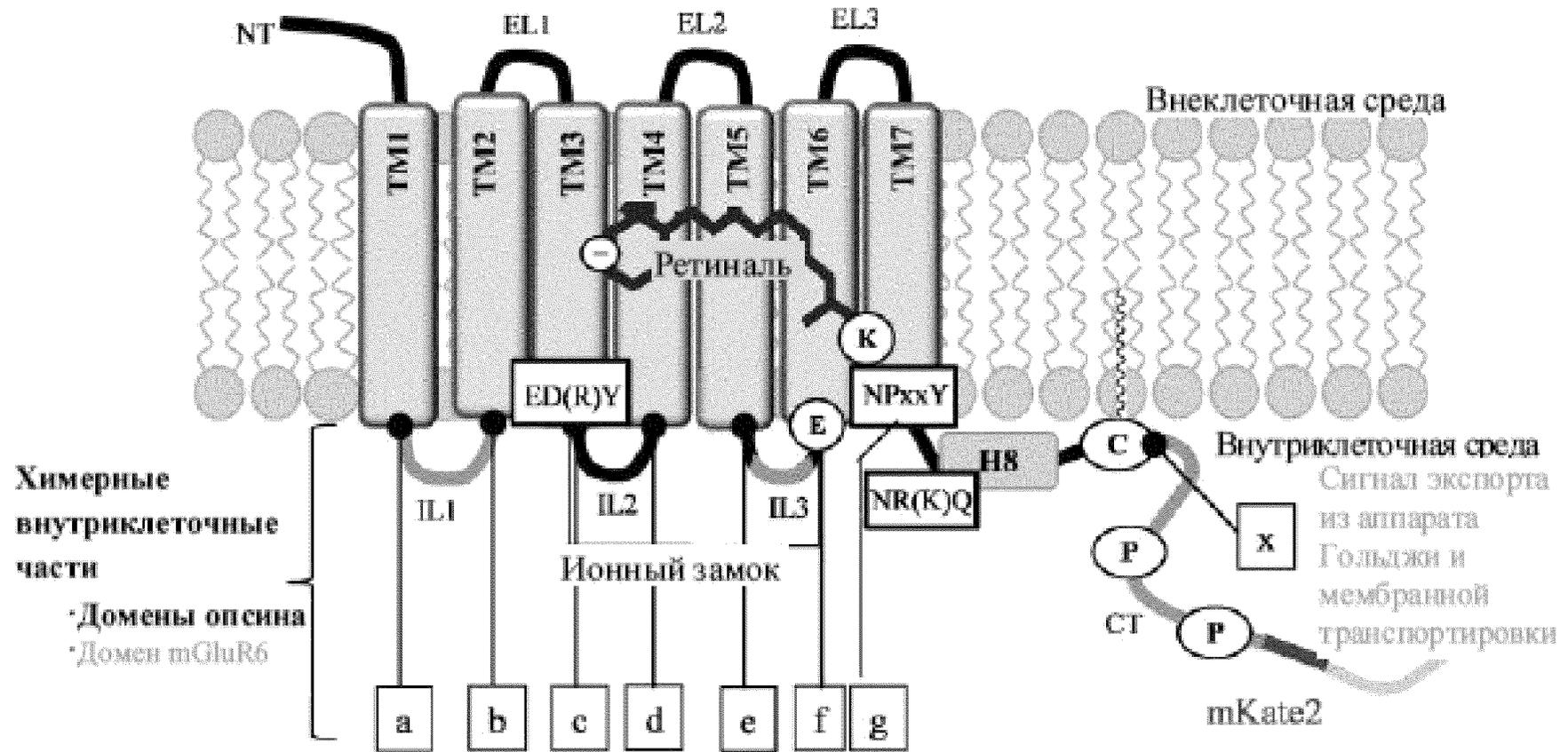
- Mela-mGluR6, дополнительно содержащий внутриклеточную петлю, в частности в соответствии с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32.

По доверенности

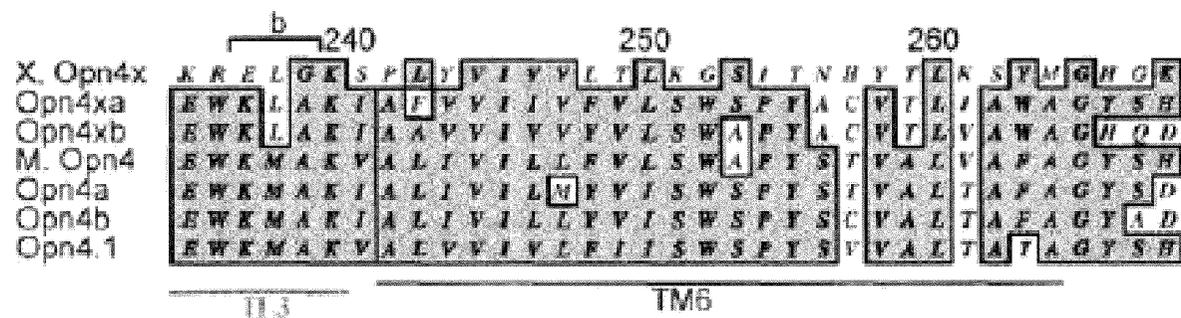
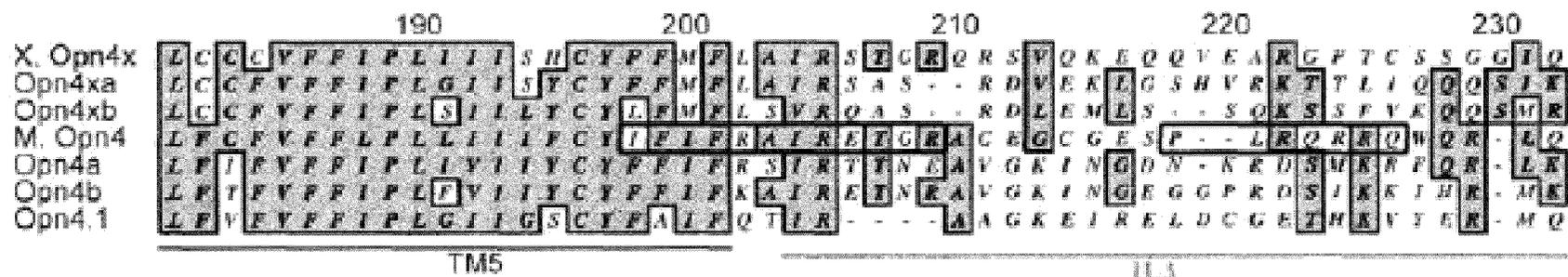


Фигура 1

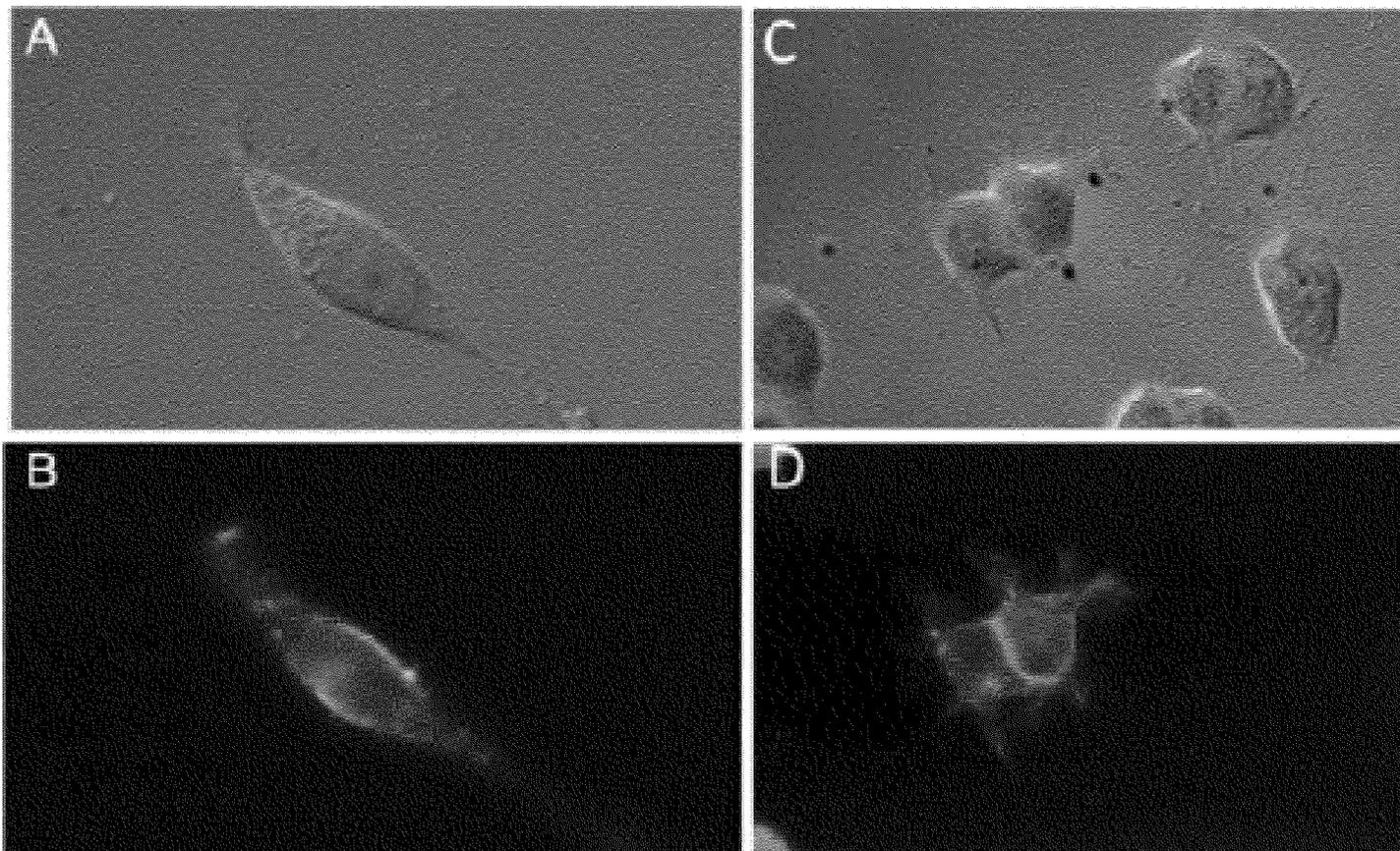




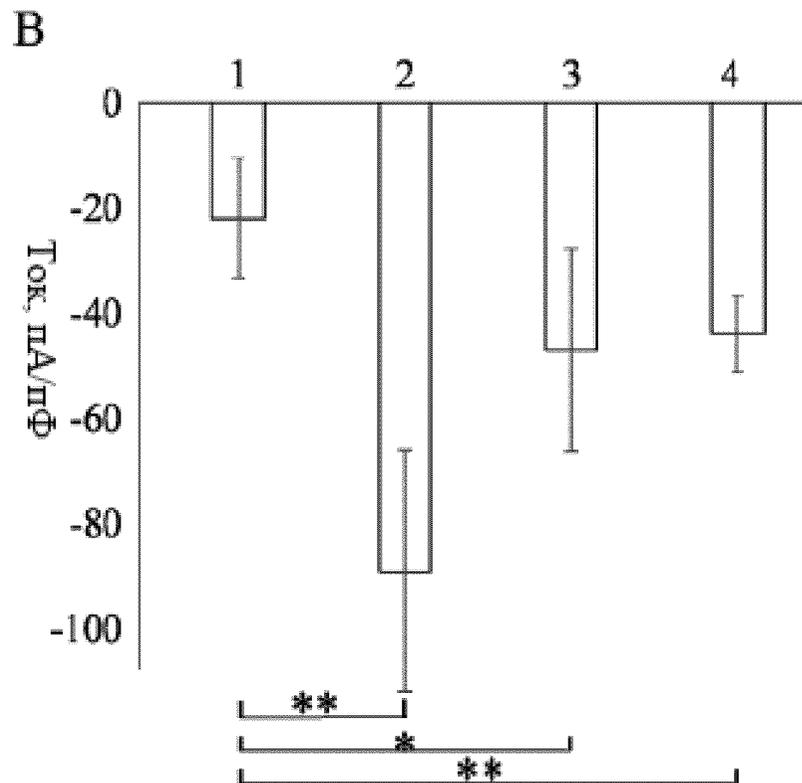
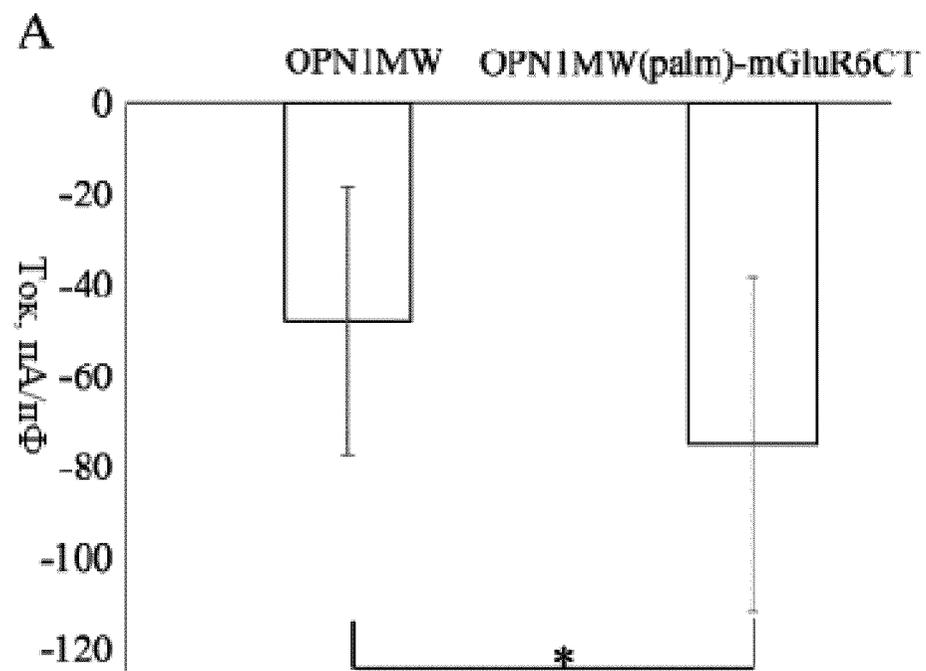
Фигура 3А



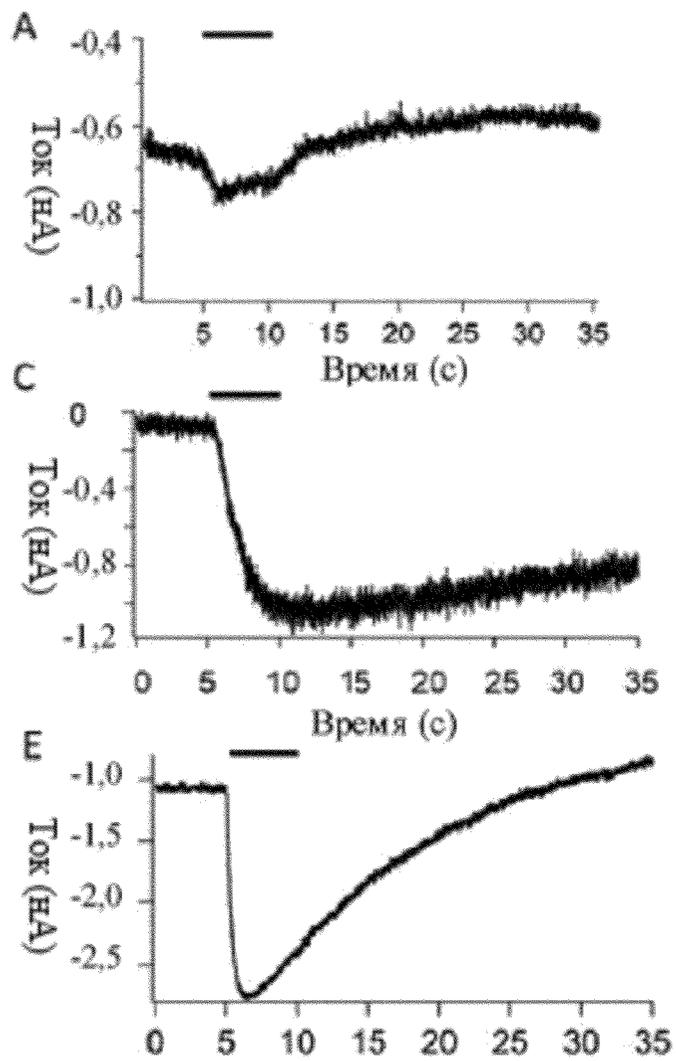
Фигура 3B



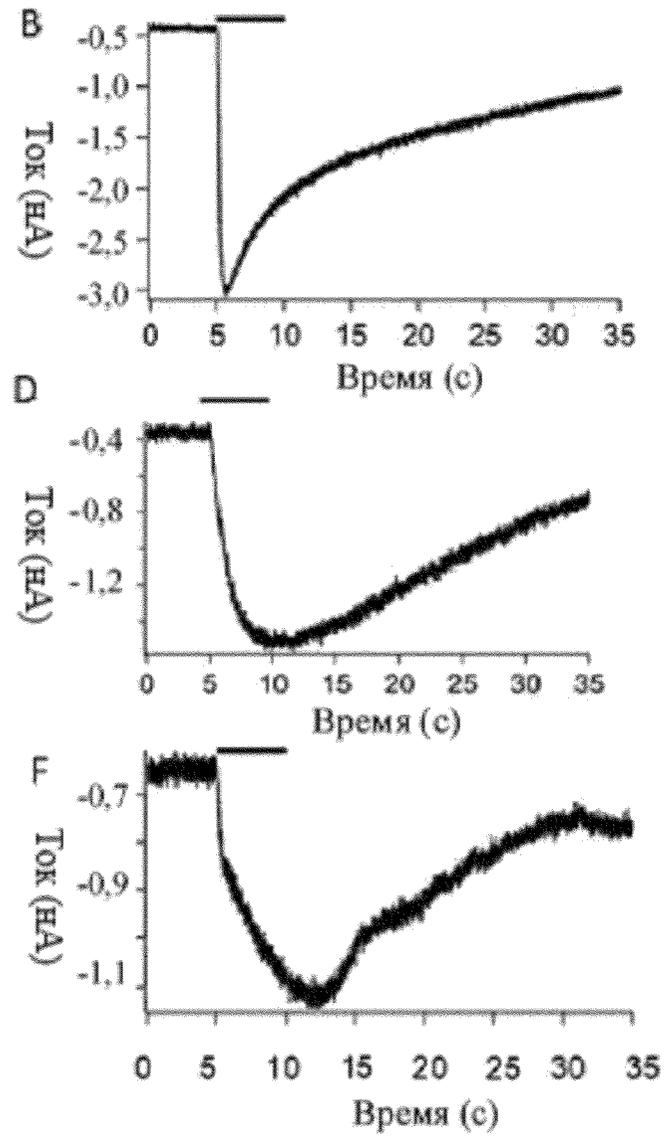
Фигура 4

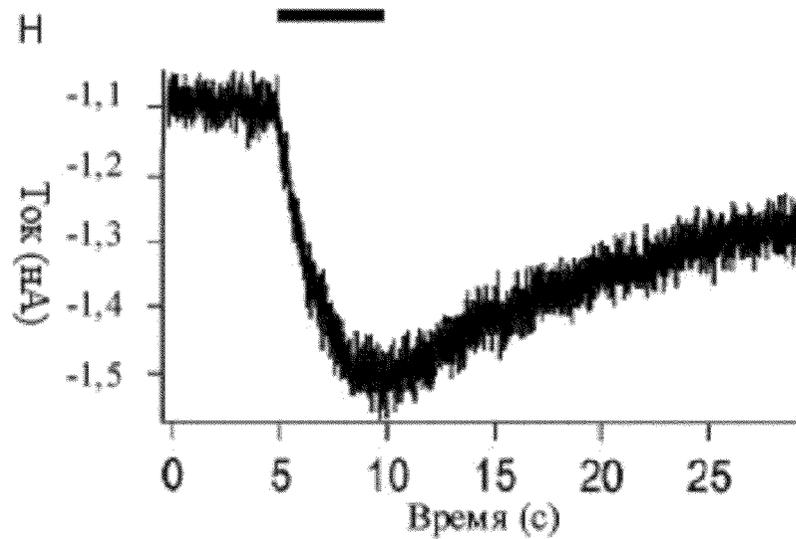
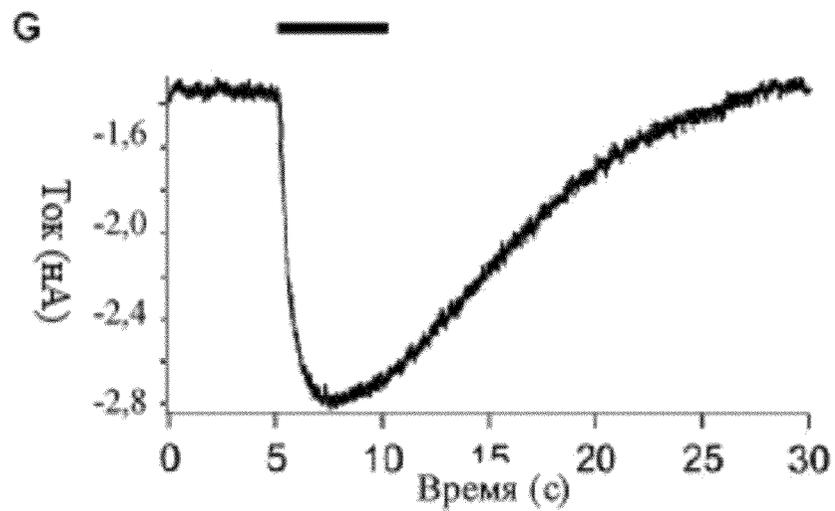


Фигура 5

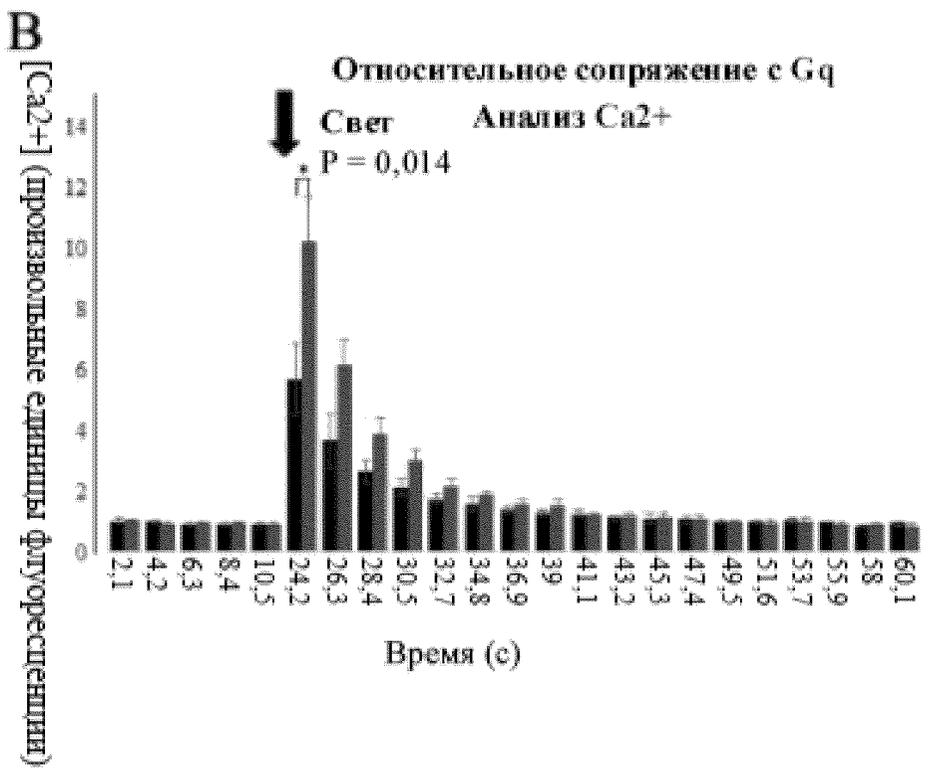
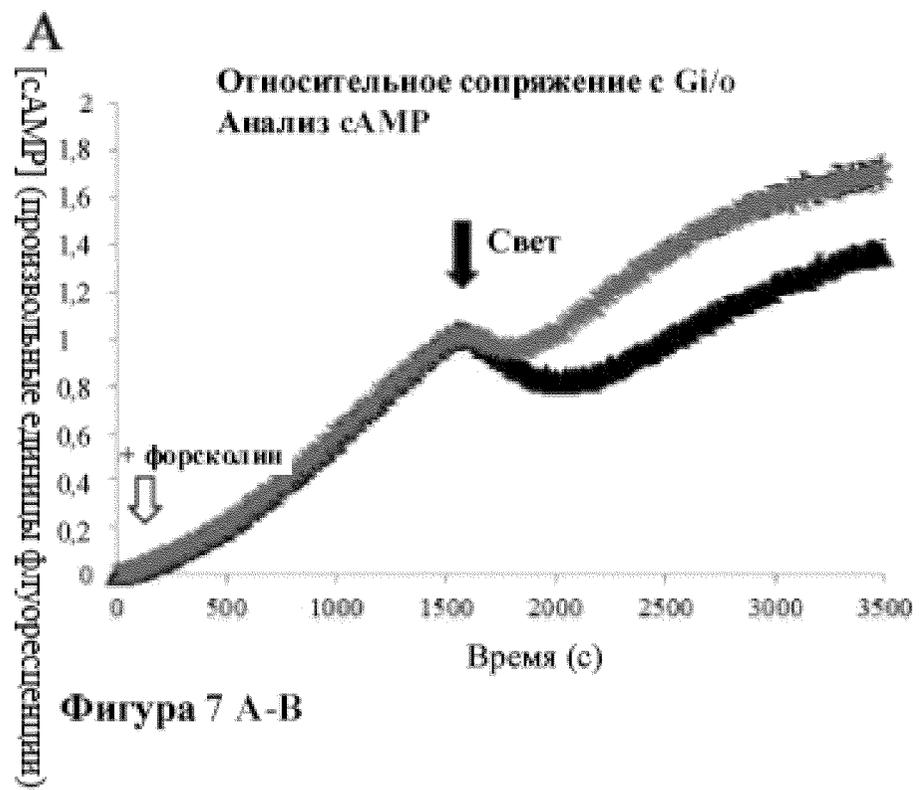


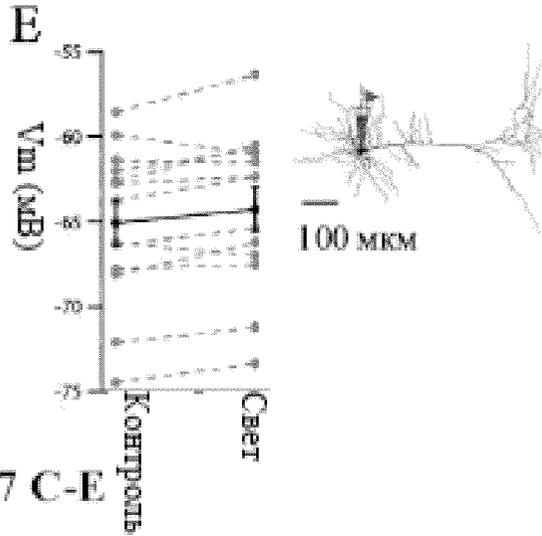
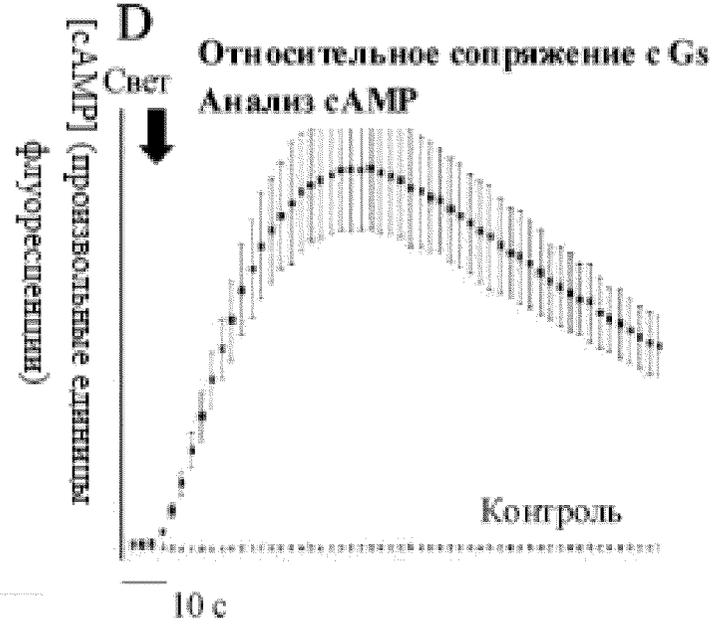
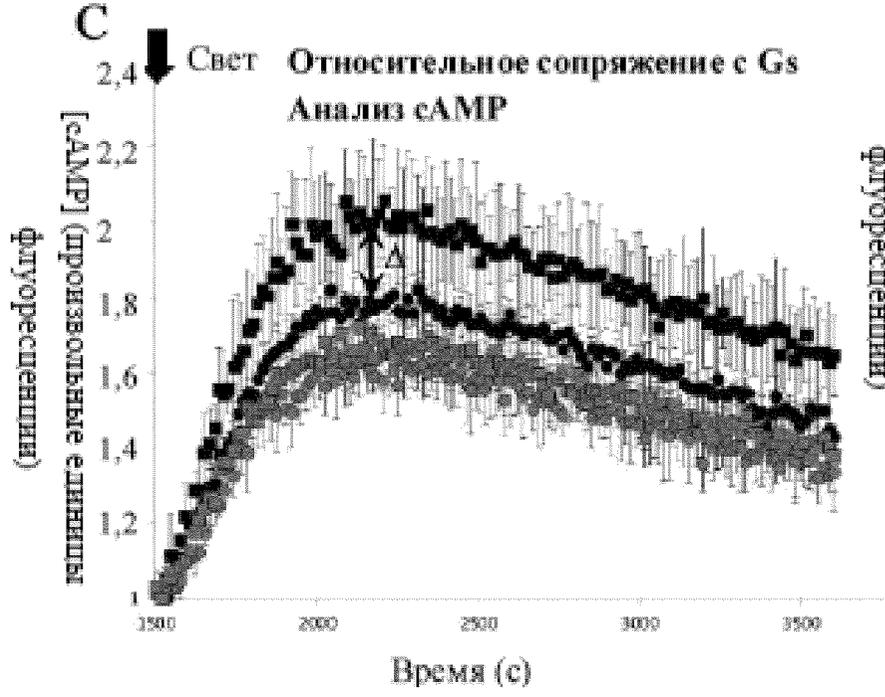
Фигура 6 А-Г



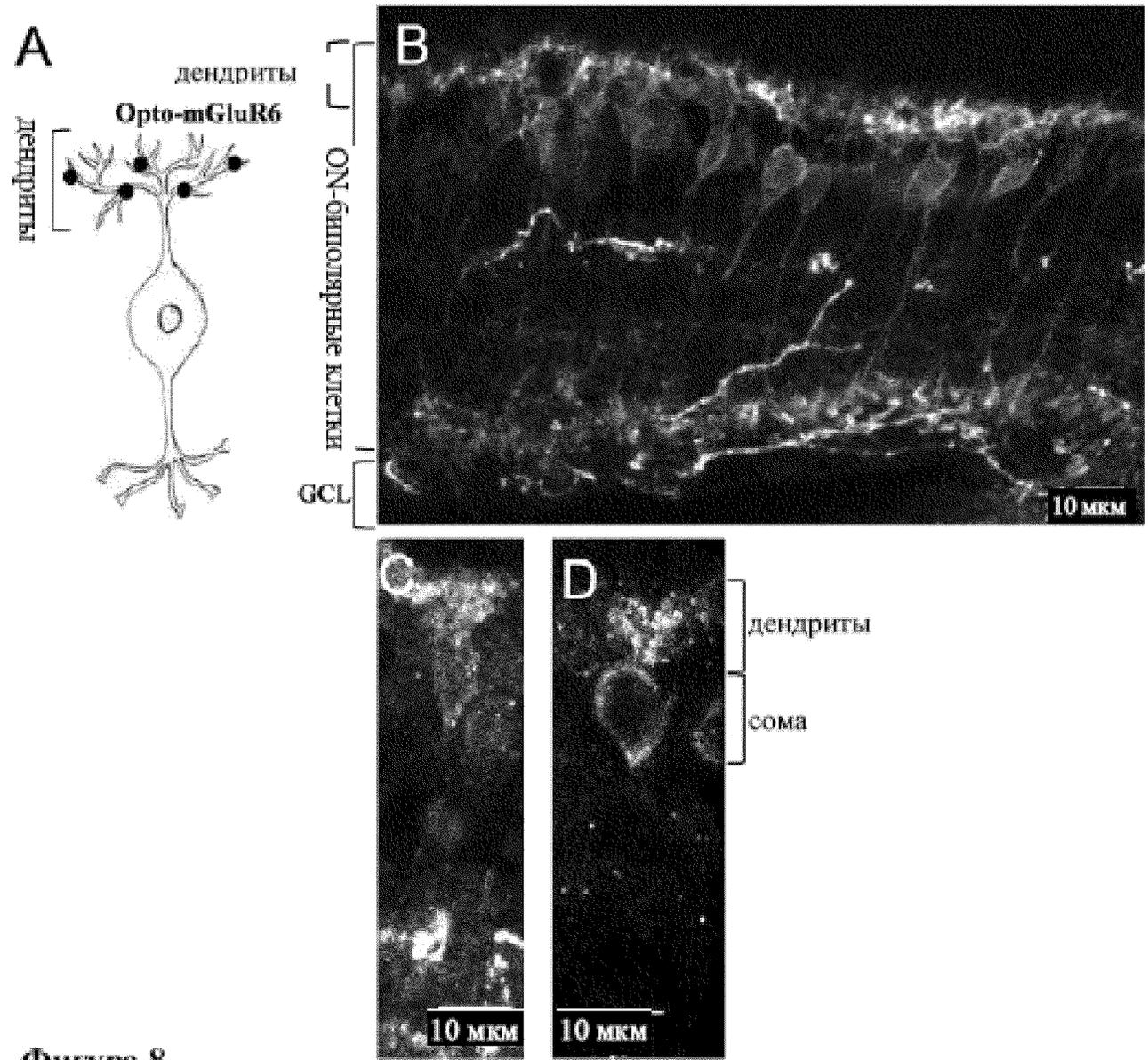


Фигура 6 Г-Н

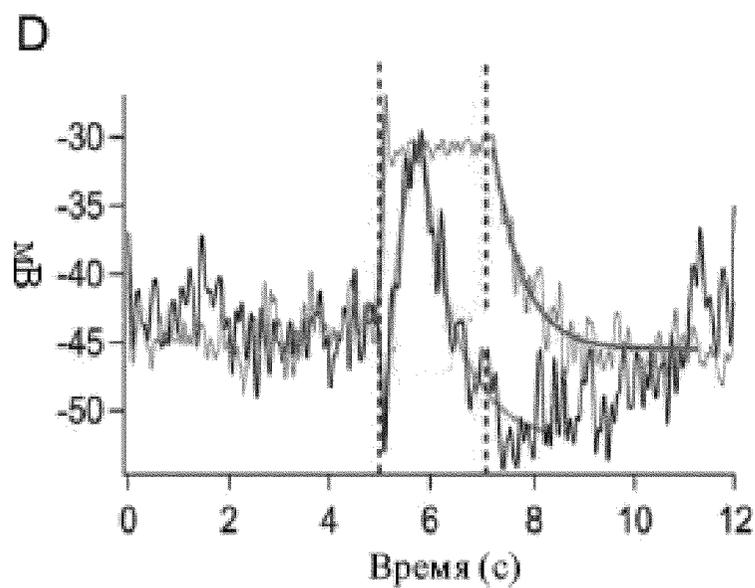
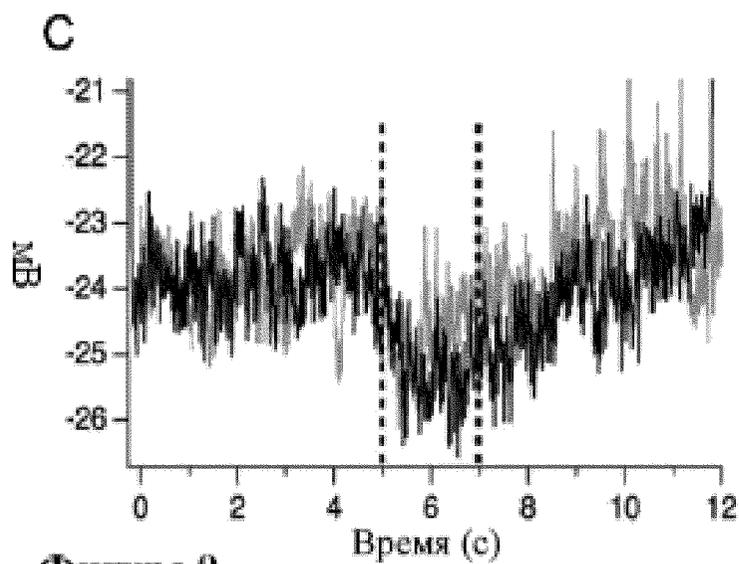
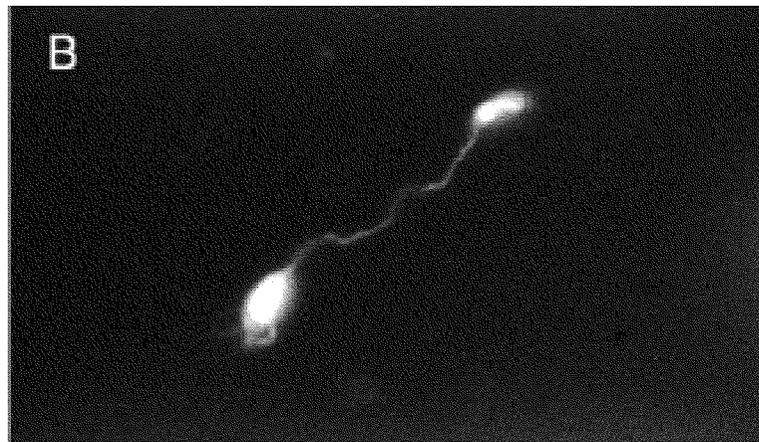
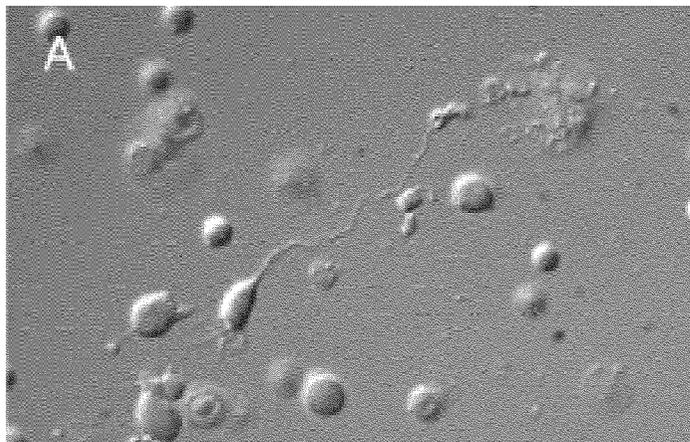




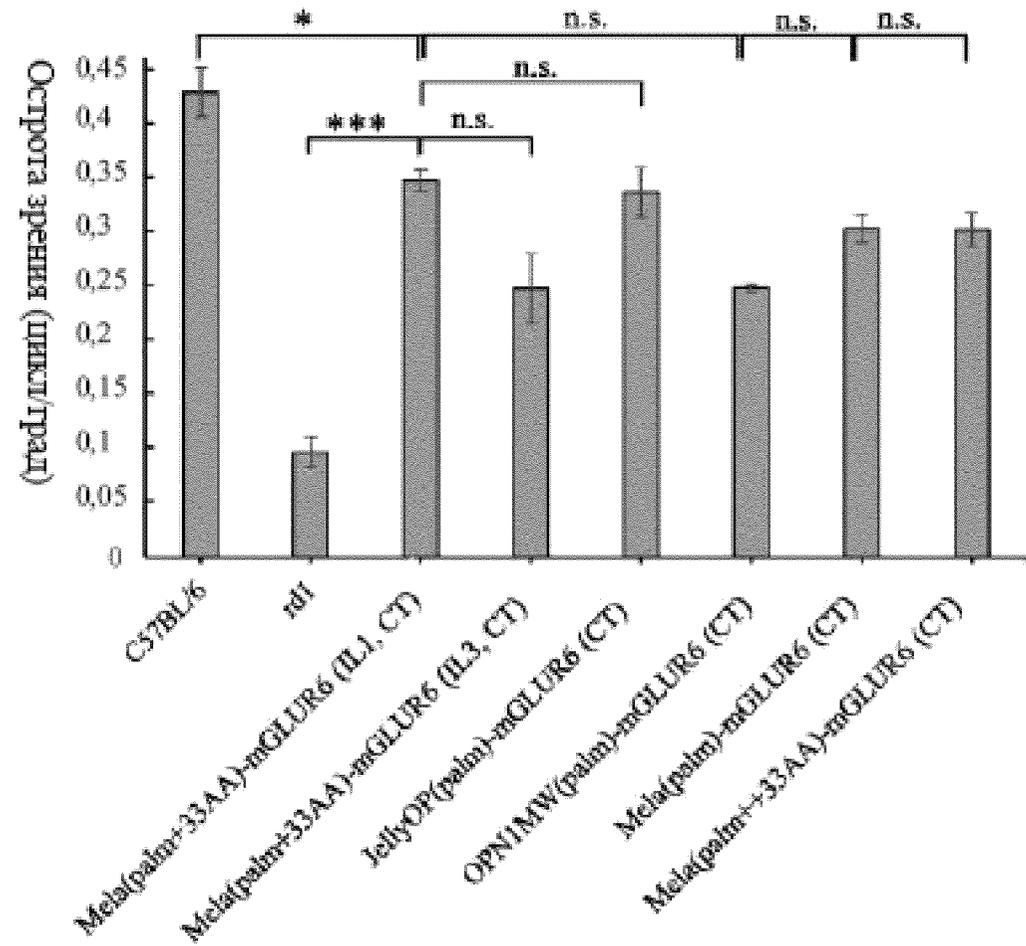
Фигура 7 С-Е



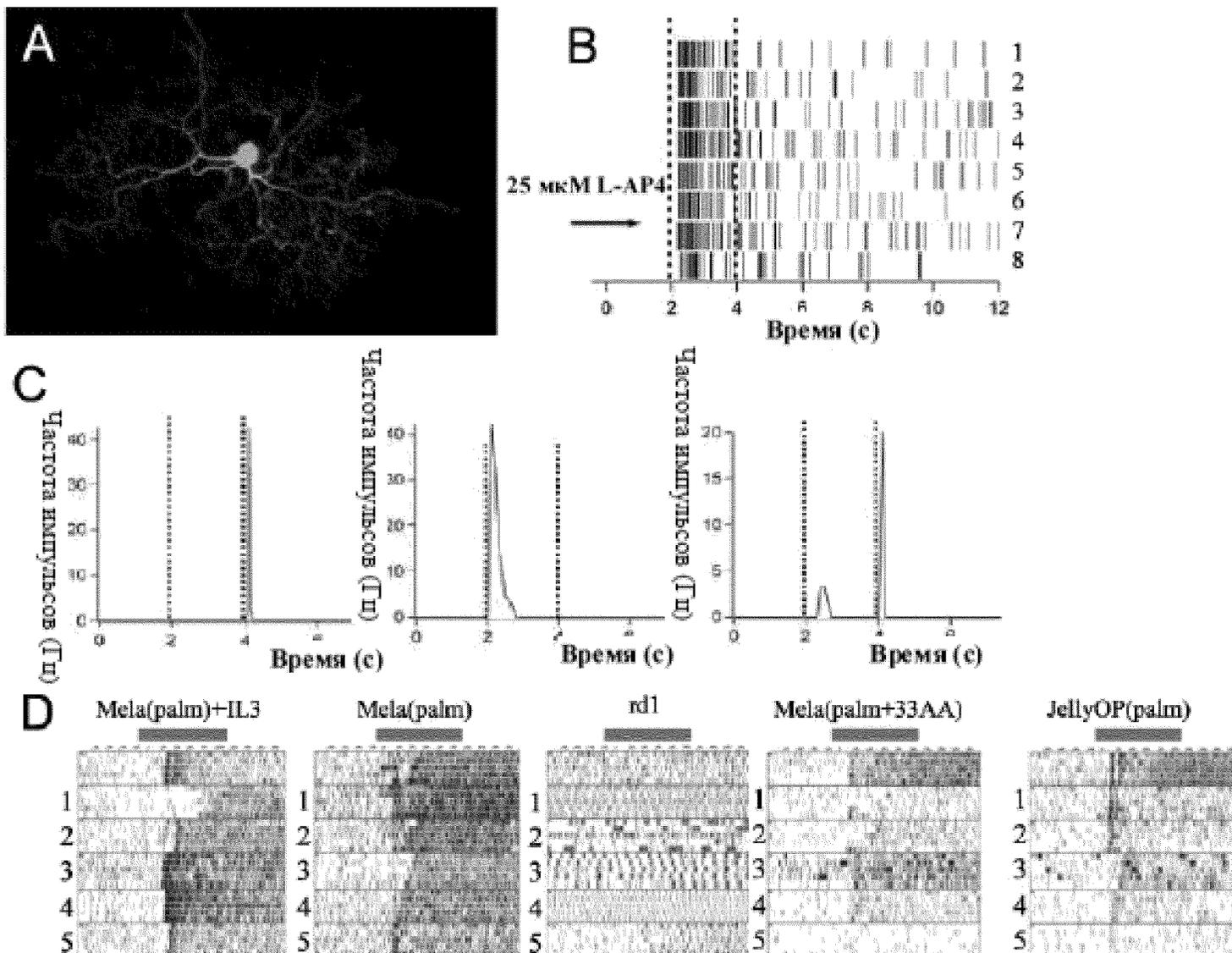
Фигура 8



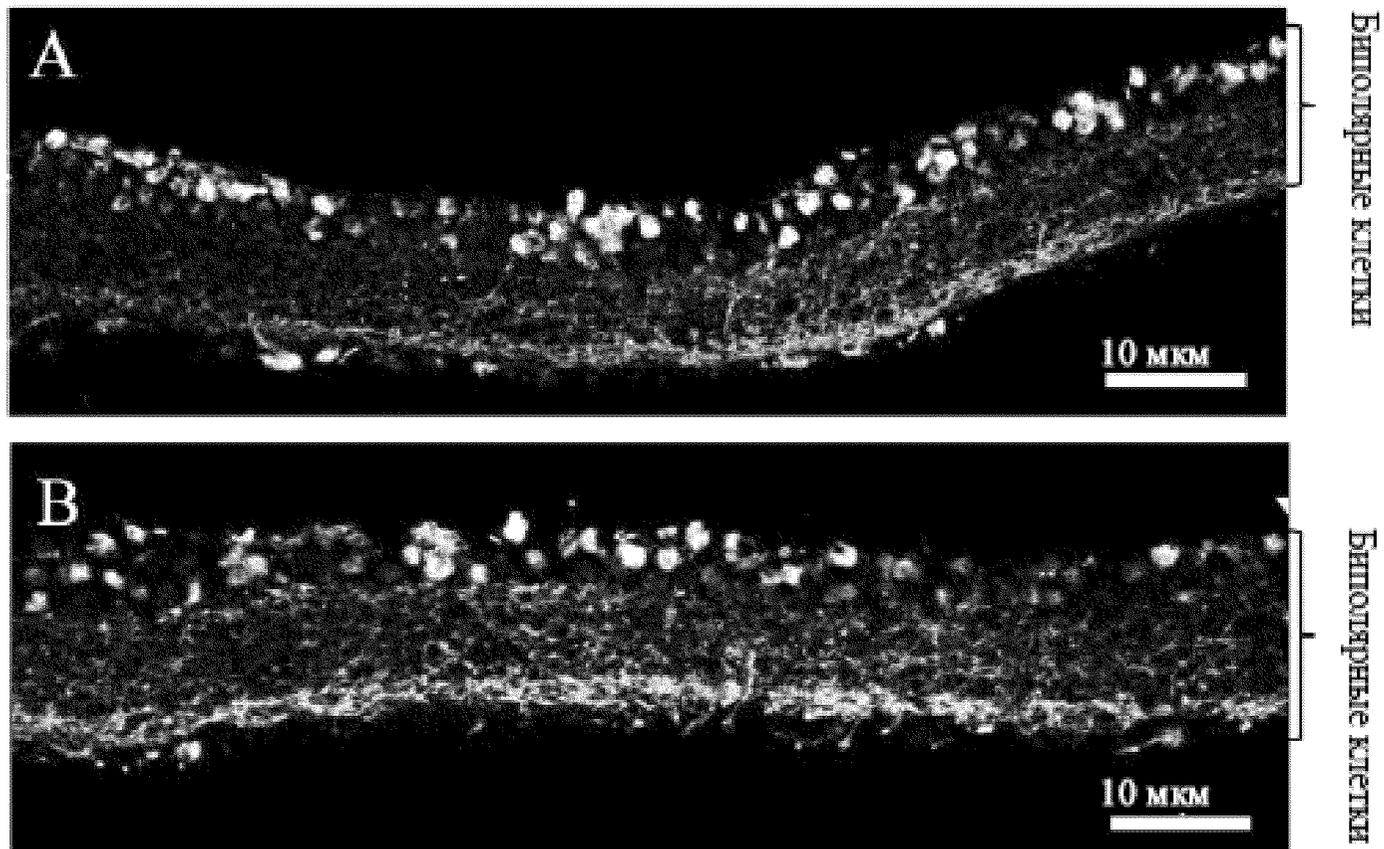
Фигура 9



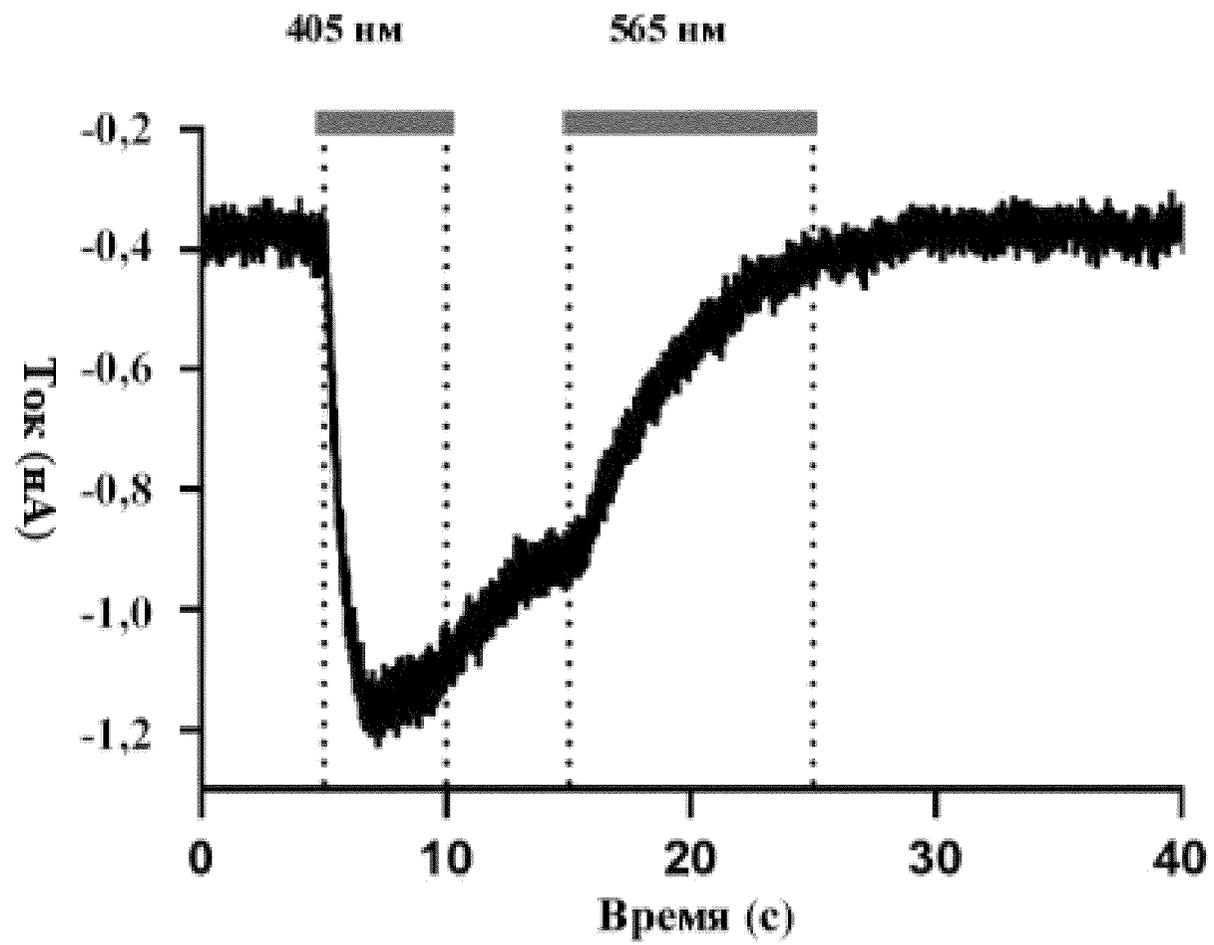
Фигура 10



Фигура 11



Фигура 12



Фигура 13